

Implication des sous-récepteurs estrogéniques dans les mécanismes neurophysiologiques de
modulation de la douleur

par

Marie-Andrée Coulombe

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Université de Sherbrooke

Composition du jury

- Membre : M. Serge Marchand, Ph.D (Directeur de recherche)
Département de Chirurgie, service de neurochirurgie, Université de Sherbrooke
- Membre : Mme. Julie Carrier, MD (Co-directrice de recherche)
Département de Médecine, service de gastroentérologie, Université de Sherbrooke
- Membre : Interne M. Philippe Sarret, Ph.D.
Département de Physiologie et Biophysique, Université de Sherbrooke
- Membre : Externe M. Pierre Beaulieu, M.D., Ph.D. F.R.C.A.
Professeur agrégé, Département de Pharmacologie
Faculté de médecine, Université de Montréal
C.P. 6128 - Succursale "Centre-ville"
Montréal (Québec) H3C 3J7
Bureau R-408, Pavillon Roger-Gaudry
Tél.:(514) 343-6338/Fax:(514)343-2291

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2009

Le _____,
Date

Le jury a accepté le mémoire de Mme Marie-Andrée Coulombe dans sa version finale

Composition du jury

- Membre : M. Serge Marchand, Ph.D (Directeur de recherche)
Département de Chirurgie, service de neurochirurgie, Université de Sherbrooke
- Membre : Mme. Julie Carrier, MD (Co-directrice de recherche)
Département de Médecine, service de gastroentérologie, Université de Sherbrooke
- Membre : Interne M. Philippe Sarret, Ph.D.
Département de Physiologie et Biophysique, Université de Sherbrooke
- Membre : Externe M. Pierre Beaulieu, M.D., Ph.D. F.R.C.A.
Professeur agrégé, Département de Pharmacologie
Faculté de médecine, Université de Montréal
C.P. 6128 - Succursale "Centre-ville"
Montréal (Québec) H3C 3J7
Bureau R-408, Pavillon Roger-Gaudry
Tél.:(514) 343-6338/Fax:(514)343-2291

Signature

Sommaire

Implication des sous-récepteurs estrogéniques dans les mécanismes neurophysiologiques de modulation de la douleur

Coulombe MA, Carrier J, Marchand S.

Introduction : Plusieurs différences existent entre les hommes et les femmes au niveau de la perception de la douleur et il semble que les hormones sexuelles soient grandement impliquées comme mécanisme responsable de ces différences. Il a été observé que les récepteurs des hormones sexuelles sont largement répandus au niveau du système nerveux central, particulièrement dans les régions responsables de la transmission et de l'inhibition de la douleur. Plusieurs études ont démontré l'importance de l'estrogène dans les mécanismes associés à la nociception. Les estrogènes sont des hormones qui se lient à deux sous-types de récepteur génétiquement distincts. Le récepteur estrogénique α (ER α) est responsable particulièrement des comportements sexuels tant chez le mâle que chez la femelle, et le récepteur estrogénique β (ER β) affecte plutôt l'anxiété et l'apprentissage spatial. Des récentes études effectuées dans nos laboratoires démontrent que l'estrogène et la progestérone semblent avoir un effet hyperalgésique, en particulier, par une moindre inhibition de la douleur, tandis que la testostérone semble plutôt avoir un effet analgésique. De plus, il a été démontré lors de l'interphase du test à la formaline que les souris ER β « knockout » (KO) présente une hypoalgésie durant cette phase. Le récepteur ER β serait donc impliqué dans la modulation de la douleur. Mais qu'en est-il de la présence du récepteur ER α ? Une étude a démontré récemment que le récepteur ER α exprimé à la membrane cellulaire modulerait la signalisation des fibres

afférentes nociceptives au niveau des ganglions de la racine dorsale (DRG). Les résultats de cette étude démontrent que le récepteur ER α aurait non seulement une fonction sur le système reproducteur, mais jouerait un rôle dans la transmission et/ou la modulation de la douleur.

Objectifs et hypothèses de recherche : Le but de cette étude est donc d'examiner du point de vu comportemental l'impact des sous-récepteurs estrogéniques sur la modulation de la transmission et de l'inhibition de la douleur dans un modèle de douleur aiguë, tonique et d'inhibition active. Afin de bien caractériser les implications possibles de ces récepteurs, des ligands spécifiques et sélectifs aux différents sous-récepteurs, ainsi que des souris ER α KO ou ER β KO ont été utilisées.

Résultats et discussion : Contrairement à ce qui avait été observé chez le rat lors d'expérimentations précédentes, les réponses nociceptives associées au test à la formaline ne présentent aucune différence entre les mâles et les femelles. Les résultats obtenus chez la souris peuvent être expliqués par la variation inter-espèce et inter-souche. Néanmoins, chez les souris ayant reçu l'agoniste spécifique au récepteur ER β , une hyperalgésie, en comparaison des souris contrôles, a été observée durant l'interphase et la phase 2a du test à la formaline. Ces résultats confirment le rôle du récepteur ER β dans la modulation des capacités inhibitrices de la douleur. Quant aux souris ER α KO, celles-ci ont présenté une augmentation du comportement douloureux en phase 1 (douleur aiguë), ce qui représente une modulation de la transmission de la douleur entre la périphérie et la moelle épinière. Une hyperalgésie spécifique aux femelles a aussi été observée lors de l'interphase. Cette variation entre les sexes pourrait s'expliquer par

une différence des mécanismes neurophysiologiques de contrôle de la douleur entre les mâles et les femelles [Gaumond et al., 2007]. Ces résultats suggèrent que l'influence du récepteur ER α sur la modulation de l'inhibition de la douleur par les centres supérieurs est dépendante du sexe.

Conclusion : Ces résultats ont permis de caractériser pour la première fois dans un modèle de comportement animal les effets distincts des deux sous-types de récepteurs estrogéniques, d'une part l'effet hypoalgésique associé à l'activation du récepteur ER α et d'autre part l'effet hyperalgésique associé à l'activation du récepteur ER β .

Mots clés : Douleur, comportements animaux, Test à la formaline, Hormones sexuelles, Récepteurs estrogéniques.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Serge Marchand qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis d'accomplir ce projet de recherche. Je tiens particulièrement à vous remercier pour votre stimulation, votre aide et votre compréhension. Vous êtes un exemple et une inspiration pour moi.

Je remercie aussi Julie Carrier pour la co-direction de cette étude. J'ai beaucoup apprécié votre vision davantage clinique et vos points de vue externe à la douleur.

Je tiens aussi à remercier les étudiants du laboratoire, particulièrement Marie-France Spooner, Philippe Goffaux, Yannick Tousignant-Laflamme et Guillaume Léonard, pour leurs aide et conseils précieux.

Un énorme merci aux étudiants et professionnel de recherche du laboratoire Carrier. Particulièrement Véronique Giroux et Gérald Bernatchez qui m'ont aidé et conseillé en ce qui concerne l'imagerie moléculaire et le génotypage des souris. Sans vous cette étude aurait été impossible. Tom, Véro, Gérald, ça a été un plaisir de travailler avec vous, les journées sont moins longues et surtout beaucoup plus plaisantes avec vous autour!

J'aimerais remercier tous les étudiants et professeur du département de physiologie ou d'autre département, ainsi que plusieurs membres du QNJPI, avec qui j'ai eu l'occasion de

discuter science, qui m'ont stimulée intellectuellement et qui m'ont permis de voir mon projet selon d'autres perspectives. Certains de ces professeurs, même s'ils ne le savent pas, ont su me transmettre leur passion, m'inspirent tous les jours et sont des exemples à suivre pour moi. Merci à vous tous.

Merci aux FRSQ de m'avoir soutenue financièrement pour une partie de cette recherche.

Merci à mes parents et à Lilith pour leur soutien moral et leur compréhension. Merci à mes amis, et à ceux qui ont croisé mon chemin pendant ces deux années, pour votre soutien et vos encouragements.

Finalement, je tiens particulièrement à remercier Rémy Béland. Merci pour ta patience, ton encouragement constant et ton soutien moral. Ta présence dans ma vie s'est reflétée autant sur moi que sur ma recherche. Tu m'as montré à être pro-active, à me poser toujours plus de questions, tu m'as enseigné plusieurs notions qui m'ont aidée à augmenter d'une coche la compréhension et l'efficacité de ma recherche. Un gros merci du fond de mon cœur.

Table des matières

| | |
|---|--------------|
| <i>Sommaire</i> | <i>iii</i> |
| <i>Remerciements</i> | <i>vi</i> |
| <i>Table des matières</i> | <i>viii</i> |
| <i>Liste des abréviations</i> | <i>xiv</i> |
| <i>Liste des tableaux.....</i> | <i>xvii</i> |
| <i>Liste des figures</i> | <i>xviii</i> |
| <i>Introduction.....</i> | <i>1</i> |
| | |
| CHAPITRE 1 : LA DOULEUR..... | 1 |
| | |
| 1.1 Introduction à la douleur..... | 1 |
| 1.1.1 Nociception versus douleur | 1 |
| 1.1.2 Diverses composantes de la douleur..... | 2 |
| 1.1.3 Les différents types de douleur..... | 3 |
| | |
| 1.2 Mécanisme de la douleur : La voie ascendante..... | 4 |
| | |
| 1.3 Mécanisme de la douleur : Les voies descendantes | 10 |
| 1.3.1 Mécanisme supraspinal | 11 |
| 1.3.2 Mécanisme spinal | 14 |
| | |
| 1.4 L'étude de la douleur | 15 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4.1 L'utilisation d'animaux en laboratoire | 15 |
| 1.4.2 Le test à la formaline | 17 |
| CHAPITRE 2 : LES HORMONES SEXUELLES..... | 26 |
| 2.1 Les hormones sexuelles | 26 |
| 2.1.1 Les hormones..... | 26 |
| 2.1.2 Les hormones stéroïdiennes | 26 |
| 2.1.3 Les hormones sexuelles | 27 |
| 2.2 L'estrogène | 28 |
| 2.2.1 Biosynthèse..... | 29 |
| 2.2.2 Le rôle des estrogènes | 29 |
| 2.2.3 Le mécanisme d'action de l'estrogène | 30 |
| 2.2.4 Les récepteurs estrogéniques | 32 |
| 2.3 Les sous-récepteurs estrogéniques | 32 |
| 2.3.1 Le sous-récepteur alpha..... | 33 |
| 2.3.2 Le sous-récepteur bêta..... | 33 |
| CHAPITRE 3 : RÉCEPTEURS ESTROGÉNIQUES ET DOULEUR..... | 35 |
| 3.1 Différence de perception de la douleur entre les mâles et les femelles | 35 |
| 3.2 L'estrogène dans la douleur | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1 Impact des hormones sexuelles sur les neurotransmetteurs et leurs récepteurs impliqués dans la douleur..... | 37 |
| 3.2.2 Impact de l'estradiol sur les peptides opioïdes et leurs récepteurs..... | 38 |
| 3.2.3 Démonstration expérimentale du rôle de l'estrogène sur la modulation de la douleur ... | 39 |
| 3.3 Le récepteur ERα dans la douleur..... | 42 |
| 3.4 Le récepteur ERβ dans la douleur | 45 |
| 3.5 L'étude des récepteurs estrogéniques dans la douleur | 47 |
| 3.5.1 L'utilisation de ligands | 47 |
| 3.5.2 L'utilisation de souris transgéniques | 49 |
| <i>Objectifs</i> | <i>51</i> |
| CHAPITRE 4 : OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE L'ÉTUDE..... | 51 |
| 4.1 Hypothèses de recherche..... | 51 |
| 4.2 Objectifs..... | 51 |
| 4.1.1 Objectif général | 51 |
| 4.2.2 Objectifs spécifiques | 51 |
| 4.3 Résultats attendus..... | 52 |
| 4.3.1 Implication du récepteur ER α | 52 |
| 4.3.2 Implication du récepteur ER β | 53 |
| <i>Matériels et méthodes</i> | <i>54</i> |

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 5 : LE PROTOCOLE..... | 54 |
| 5.1 Les animaux utilisés | 54 |
| 5.1.1 Objectif 1 : Confirmer les résultats de Gaumond et al., 2002 et Gaumond et al., 2005.. | 54 |
| 5.1.2 Objectif 2 : Ligand du récepteur ER β | 55 |
| 5.1.3 Objectif 3 : Ligand du récepteur ER α | 56 |
| 5.1.4 Objectif 4 : Souris ER α KO | 56 |
| 5.2 Génotypage..... | 57 |
| 5.3 Les chirurgies..... | 59 |
| 5.3.1 Ovariectomie | 59 |
| 5.3.2 Castration..... | 60 |
| 5.4 Les remplacements hormonaux | 61 |
| 5.4.1 Implants (objectif 4) | 61 |
| 5.4.2 Ligands injectés (objectif 2 et 3) | 61 |
| 5.5 Test à la formaline | 62 |
| 5.6 Analyse des données | 62 |
| <i>Résultats</i> | 65 |
| CHAPITRE 6 : RÉSULTATS..... | 65 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1 Caractéristique du comportement douloureux entre les sexes des souris C57BL/6j (objectif 1)..... | 65 |
| 6.1.1 Comparaison des comportements nociceptifs associés au test à la formaline entre les mâles et les femelles C57BL/6j..... | 65 |
| 6.1.2 Influence des hormones sexuelles femelles sur les comportements nociceptifs associés au test à la formaline..... | 68 |
| 6.2 Influence de l'injection d'agonistes sélectifs des récepteurs estrogéniques α et β sur les réponses nociceptives au test à la formaline..... | 72 |
| 6.3 Influence de la délétion du gène codant pour le récepteur ERα sur le comportement nociceptif associé au test à la formaline..... | 76 |
| 6.3.1 Modification des comportements nociceptifs associés au test à la formaline chez les femelles ER α KO (Objectif 4) | 76 |
| 6.3.2 Modification des comportements nociceptifs associés au test à la formaline chez des souris mâles ER α KO..... | 79 |
| 6.4 Validation interne : Hypertrophie de l'utérus des différents groupes de souris femelles | 81 |
| <i>Discussion</i> | 85 |
| CHAPITRE 7 : DISCUSSION DES RÉSULTATS..... | 85 |
| 7.1 Caractéristique inter-sexe des souris C57BL/6j et rôle des hormones sexuelles dans la douleur..... | 85 |

| | |
|--|------------|
| 7.1.1 Différence mâle/femelle | 85 |
| 7.1.2 Implication des hormones sexuelles femelles dans la douleur | 87 |
| 7.2 Rôle du récepteur ERβ dans la modulation de la douleur..... | 96 |
| 7.3 Rôle du récepteur ERα dans la modulation de la transmission et de l'inhibition de la douleur..... | 102 |
| 7.4 Critique du protocole | 111 |
| <i>Conclusion</i> | <i>114</i> |
| CHAPITRE 8 : CONCLUSION..... | 114 |
| <i>Bibliographie</i> | <i>117</i> |

Liste des abréviations

| | |
|-------------|--|
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamine |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AP1 | « Activator protein 1 » (Protéine activatrice 1) |
| ARC | « Arcuate nucleus » (Noyau arqué du thalamus) |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| AVP | Arginine vasopressine |
| BHE | Barrière hémato-encéphalique |
| BNST | « Bed nuclei of the stria terminalis » |
| CCPA | Conseil canadien de protection des animaux |
| CGRP | « Calcitonin gene-related peptide » |
| CRE | « cAMP response element » |
| CREB | « cAMP response element-binding » |
| CYP19 | Cytochrome P450, famille 19 |
| DAG | Diacylglycérol |
| DPN | Diaryl propionitrile |
| DRG | « Dorsal root ganglia » (ganglion de la racine dorsale) |
| E2 | Estradiol |
| ER | « Estrogen receptor » (Récepteur estrogénique) |
| ER α | « Estrogen receptor alpha » (Récepteur estrogénique de type alpha) |
| ER β | « Estrogen receptor beta » (Récepteur estrogénique de type bêta) |

| | |
|---------|---|
| ERB-041 | 2-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-7-vinyl-1,3 benzoxazol-5-ol |
| ERE | « Estrogen response element » (Élément de réponse à l'estrogène) |
| ERK | « Extracellular signal-regulated kinases » |
| FL | Comportement de « trépidement » |
| FSH | « Follicle-stimulating hormone » |
| GABA | « Gamma amino-butyric acid » (Acide gamma aminobutyrique) |
| GAD | Glutamate décarboxylase |
| GDX | Gonadectomisé |
| IASP | « International Association for the Study of Pain » (Association internationale pour l'étude de la douleur) |
| IP3 | Inositol trisphosphate |
| KW | Test de Kruskal-Wallis |
| LDL | « Low density lipoprotein » (Lipoprotéine de faible densité) |
| LH | « Luteinizing hormone » |
| LK | Comportement de « lèchement » |
| MAPK | « Mitogen-activated protein (MAP) kinases » |
| MPOA | « Medial preoptic area » (Aire médiale préoptique de l'hypothalamus) |
| MW | Test de Mann-Whitney |
| NA | Noradrénaline |
| NADPH | Forme réduite du NADP+ |
| NRM | Noyau du Raphé Magnus (RMN) |
| OT | Oxytocine |

| | |
|---------------------|--|
| OVX | Ovariectomisé |
| P450 _{scc} | « Side chain cleavage P450 » |
| PKA | Protéine kinase A |
| PPT | « Propylpyrazol tris-phenol » |
| PR | « Progesterone receptor » (Récepteur de la progestérone) |
| PVN | « Paraventricular nuclei » (Noyau paraventriculaire) |
| SCP-2 | « Sterol Carrier Protein-2 » (Protéine transporteur de stérol-2) |
| SGPA | Substance grise périaqueducule (PAG) |
| SHAM | Faux traitement (traitement simulé) |
| SNC | Système nerveux central (CNS) |
| SON | « Supra optic nuclei » (Noyau supra-optique) |
| SP | Substance P |
| SRE | « Serum Response Element » (Élément de réponse au sérum) |
| StAR | « Steroidogenic acute regulatory protein » |
| TPH | Tryptophane hydroxylase |
| VMH | « Ventromedial hypothalamus » |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Les différents groupes de souris (objectif 1) | 55 |
| Tableau 2 : Les différents groupes de souris associés à l'étude des effets pharmacologique d'un agoniste spécifique aux récepteurs ER β (objectif 2) | 56 |
| Tableau 3 : Les différents groupes de souris associés à l'étude des effets pharmacologiques d'un agoniste spécifique et sélectif aux récepteurs ER α (objectif 3) | 56 |
| Tableau 4 : Les différents groupes de souris associés à la caractérisation de l'implication d'une déficience en ER α (objectif 4) | 57 |
| Tableau 5 : Les oligonucléotides utilisés pour les protocoles de génotypage | 58 |
| Tableau 6 : Étapes du protocole de PCR associé au génotypage des souris ER α KO | 59 |
| Tableau 7: Ligands utilisés pour les différents groupes de souris | 61 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1. Voie ascendante de la douleur | 10 |
| Figure 2. Voies descendantes de modulation de la douleur | 12 |
| Figure 3. Modulation de la transmission spinale des signaux nociceptifs | 14 |
| Figure 4. Graphique type de résultats de test à la formaline | 21 |
| Figure 5. Démonstration de l'interphase. | 23 |
| Figure 6. Voie de synthèse des hormones stéroïdiennes | 27 |
| Figure 7. L'action d'un estrogène sur une cellule cible : voie classique. | 31 |
| Figure 8. Comparaison de la réponse nociceptive au test à la formaline entre les mâles et les femelles | 36 |
| Figure 9. Modulation du comportement nociceptif associé au test à la formaline selon le status hormonal | 41 |
| Figure 10. Influence de l'estrogène sur l'influx calcique engendré par l'ATP dans des neurones de souris ER α KO et ER β KO | 44 |
| Figure 11. Les résultats du test à la formaline chez les souris mâles et femelles ER β KO | 46 |
| Figure 12. Effet des différents agonistes sur l'hypertrophie de l'utérus | 49 |
| Figure 13. Influence de la présence et de l'absence d'hormones sexuelles sur le comportement nociceptif lors des différentes phases du test à la formaline chez des souris C57BL/6 | 67 |
| Figure 14. Influence des hormones sexuelles chez les femelles sur les réponses nociceptives associées au test à la formaline | 71 |

| | |
|--|-----|
| Figure 15. Comportements nociceptifs associés au test à la formaline des souris injectées avec un ligand spécifique à ER α ou ER β | 75 |
| Figure 16. Comportements nociceptifs associés au test à la formaline des femelles ER α KO et ER α WT | 78 |
| Figure 17. Comportements nociceptifs associés au test à la formaline des mâles ER α KO et ER α WT | 80 |
| Figure 18. Poids des utérus des souris femelles en fonction de leur statut hormonal | 82 |
| Figure 19. Poids de l'utérus des souris femelles en fonction de la présence ou non du récepteur ER α | 84 |
| Figure 19. Graphique résumé de l'implication des hormones sexuelles femelles dans la modulation de la douleur | 87 |
| Figure 20. Graphique résumé de l'implication du récepteur ER β dans la modulation de la douleur | 96 |
| Figure 21. Graphique résumé de l'implication du récepteur ER α dans la modulation de la douleur | 102 |
| Figure 22. Graphique résumé de l'implication du récepteur ER α et ER β dans la modulation de la douleur | 114 |

Introduction

CHAPITRE 1 : LA DOULEUR

1.1 Introduction à la douleur

La douleur est une expérience hautement subjective se définissant comme étant une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrite en termes de telles lésions [IASP, 1994]. Lorsqu'on étudie la physiologie de la douleur, on parle plutôt de nociception, c'est-à-dire les mécanismes neurophysiologiques associés à la douleur. Lorsque des nocicepteurs (mécaniques, thermiques ou chimiques) sont activés, il y a création d'une activité chimioélectrique qui se propage à travers des fibres sensorielles (A β , A δ et C), de la périphérie jusqu'à la moelle, où l'information est redirigée afin d'être intégrée en terme d'intensité, de qualité et d'appréciation spatio-temporelle. Ce sont ces signaux qui permettent finalement l'activation des muscles effecteurs au besoin.

La douleur est modulée par un système de régulation complexe. Il est représenté comme étant un réseau vaste et multiple du système nerveux [Marieb, 1999].

1.1.1 Nociception versus douleur

Le terme nociception est défini, selon l'IASP (International Association for the Study of Pain), comme étant l'activité chimioélectrique des récepteurs et des fibres nerveuses provoquée par

une stimulation potentiellement dangereuse pour l'organisme. En fait, il s'agit de l'ensemble des composantes neurophysiologiques mettant en œuvre tous les mécanismes de défense du corps et permettant la perception de la douleur. En d'autres termes, la douleur joue un rôle de signal d'alarme pour le corps, afin de le prévenir d'une atteinte à son intégrité physique [Rey, 1993].

1.1.2 Diverses composantes de la douleur

La douleur est composée de quatre grandes sphères caractéristiques. Premièrement, l'aspect sensori-discriminatif, qui permet la localisation et la mesure de l'intensité d'un stimulus nociceptif. Deuxièmement, une composante motivo-affective mettant en jeu l'ensemble du système limbique et permettant l'incorporation de l'aspect émotionnel associé à la douleur. Troisièmement, l'aspect cognitif, qui permet de concentrer son attention, l'anticipation de certains événements ou sensations, ainsi que la mémorisation de la douleur. Quatrièmement, la dimension comportementale, qui induit une réaction au stimulus nociceptif, qu'elle soit motrice, verbale et/ou végétative [Calvino & Grilo, 2006]. Ces différentes sphères ne sont pas indépendantes, mais bien inter-relationnelles. Une seule stimulation nociceptive peut mener à un long enchaînement d'évènements moléculaires, menant à l'intégration de toutes ces facettes de la douleur.

1.1.3 Les différents types de douleur

Douleur aiguë

La douleur aiguë est une douleur vive et immédiate. Elle ne dure que quelques secondes/minutes, et est généralement causée par un stimulus thermique (contact de la peau avec du feu) ou mécanique (un pincement, un coup). [Guirimand & Bars, 1996, Serpell et al., 1998]

Douleur inflammatoire

L'inflammation fait généralement suite à une lésion tissulaire, mais peut se présenter pour d'autres raisons. Lors d'une blessure, il y a libération, par diffusion des vaisseaux sanguins vers l'organe affecté, de médiateurs de l'inflammation telle que la substance P (libérée par les terminaisons nerveuses et qui possèdent des propriétés vasodilatatrices favorisant l'exsudation plasmatique), le « calcitonin gen-related peptide » (CGRP), l'histamine (produit par la dégranulation des mastocytes), la bradykinine, des prostaglandines et la sérotonine (produite suite à l'agrégation plaquettaire). Certaines de ces substances sont algogènes, par exemple la sérotonine, la bradykinine et les ions H^+ et K^+ , ce qui facilite le déclenchement d'influx nerveux. D'autres sont plutôt sensibilisatrices, comme les prostaglandines, les leucotriènes et l'histamine. [Basbaum & Woolf, 1999, Julius & Basbaum, 2001]

La douleur chronique

La douleur chronique est une sensation douloureuse qui persiste pendant plusieurs mois (supérieure à trois mois selon les critères de l'IASP). Elle est généralement causée par de l'inflammation et/ou à une sensibilisation des nocicepteurs des voies transmettant l'influx nociceptif au niveau spinal [Calvino & Grilo, 2006].

1.2 Mécanisme de la douleur : La voie ascendante

Une stimulation nociceptive débute tout d'abord par la stimulation d'un nocicepteur qui est la terminaison libre d'une fibre nerveuse que l'on retrouve au niveau de la peau, des muscles et des viscères [Coutaux et al., 2005, Guirimand & Bars, 1996]. Lorsque ces fibres sont stimulées, elles utilisent l'énergie du stimulus qu'il soit thermique, mécanique ou chimique, et le transforme en énergie électrique [Coutaux et al., 2005]. Cette transduction est créée par la dépolarisation de la membrane cellulaire, formant ainsi un influx nerveux. Si l'amplitude de cette dépolarisation est suffisante, elle produira la dépolarisation de la fibre afférente qu'on appellera alors un potentiel d'action. Ce potentiel d'action se propage ensuite dans une fibre. En général, un stimulus recrute plusieurs nocicepteurs et se propage dans plusieurs fibres [Flor, 2002].

La dépolarisation d'une fibre dépend de l'intensité du stimulus et du type de fibre nerveuse. Le neurone se dépolarisera de façon graduelle jusqu'à une réponse de 100 %. Un potentiel d'action est une activité de type « tout ou rien ». Le potentiel d'action sera déclenché uniquement si l'intensité de la stimulation est suffisante. De façon générale, un potentiel d'action possède des caractéristiques spécifiques de durée et d'amplitude. [Marieb, 1999]

Les cellules réceptrices de la périphérie ne sont pas spécialisées dans la nociception [Guirimand & Bars, 1996]. Selon le type et l'intensité du stimulus, différents types de neurones sensoriels seront activés. Il existe trois types de fibre nerveuse somatique conduisant l'information sensorielle sous forme d'influx nerveux : les fibres A β , A δ et C . Elles sont divisées en trois

classes relatives à leur diamètre, leur vitesse de transmission, et les informations sensorielles qu'elles transportent.

Les fibres A β :

Il s'agit de fibres de grand calibre (6-20 μm) qui sont myélinisées. La gaine de myéline, formée de neurolemmocytes [Marieb, 1999], protège l'axone et l'isole électriquement. Cela permet d'accroître la vitesse de transmission de l'influx nerveux à travers la fibre. En effet, grâce à la gaine de myéline, l'information généralement non-nociceptive (toucher, proprioception) se propage par les nœuds de Ranvier des fibres A β à une très grande vitesse (30-120 m/s).

Les fibres A δ

Ces fibres sont de plus petits calibres en comparaison des fibres A β , de 2 à 5 μm . Elles sont aussi myélinisées, mais de façon moins importante. Cela leur permet de transmettre l'information de façon relativement rapide (4-40 m/s) et précise. L'information que les fibres A δ transportent est nociceptive, provenant principalement de stimuli mécaniques.

Les fibres C

Les fibres C, aussi appelées nocicepteurs polymodaux, sont de beaucoup plus petit calibre (0,3-3 μm) et ne sont pas myélinisées. Elles transportent l'information nociceptive (mécanique, thermique et chimique) de façon plus lente (environ 2 m/s) et de façon diffuse. Il s'agit de la fibre la plus abondante puisqu'elle représente 80 % des fibres afférentes cutanées [Kumazawa, 1990].

Le corps cellulaire de ces fibres sensorielles se trouve dans les ganglions de la racine rachidienne postérieure [Wall et al., 1989]. C'est à ce niveau que les nerfs périphériques rejoignent le système nerveux central. Dans le cas des fibres A δ et C, la fibre nerveuse se divise collatéralement sur 1 à 6 segments, ce qu'on appelle le faisceau de Lissauer [Wall et al., 1989]. Cette diffusion étagée crée le caractère diffus et brouille l'aspect discriminatif du signal douloureux. Ce sont les fibres A δ et C qui sont responsables respectivement de la première et de la seconde douleur. La première douleur est une douleur localisée et rapide liée aux fibres A δ , tandis que la seconde douleur est plus diffuse et lente et correspond à l'activation des fibres C.

Les signaux nociceptifs voyagent de la périphérie vers la moelle dans des fibres afférentes nociceptives. Celles-ci entrent dans le système nerveux central par les cornes dorsales de la moelle épinière où elles font synapse avec des neurones secondaires transportant l'information vers les centres supérieurs.

La moelle épinière est une étape très importante de la transmission nociceptive. Il s'agit non seulement de l'étape de transition entre la périphérie et les centres supérieurs, mais aussi une étape de modulation, où l'information nociceptive peut être inhibée ou amplifiée. La substance blanche de la moelle est une zone formée de fibres myélinisées. Elle contient les axones des cellules nerveuses ascendantes et descendantes. La substance grise est une zone riche en neurones et fibres nerveuses amyélinisées. Elle est composée principalement de corps cellulaires et de cellules gliales [Brasseur et al., 1997, Marieb, 1999]. La substance grise se divise en 10

lames, dont 6 sont situées dans la corne dorsale, 3 dans la corne ventrale et une entourant l'épendyme [Brasseur et al., 1997].

Les cornes dorsales sont les plus intéressantes dans l'étude de la douleur, puisque c'est au niveau dorsal que pénètre, de façon perpendiculaire, une majorité de fibres nociceptives A δ et C, répondant aux stimuli périphériques de hautes intensités. Ces fibres projettent leurs afférences particulièrement dans les couches superficielles I et II, ainsi que plus profondément dans les couches V, VI, VII et X. C'est à ces niveaux que les fibres afférentes primaires font synapse avec les neurones secondaires [Brasseur et al., 1997]. Dans le cas des fibres non nociceptives A β , lors de leur entrée dans la moelle, elles se divisent en deux branches. La première branche est ascendante et permet à la fibre de pénétrer sur plusieurs segments de la substance grise médullaire. La seconde branche rejoint la jonction cervicobulbaire (les noyaux Gracilis et cunaeus), où elle active le système lemniscal [Wall et al., 1989, Bonnet, 1991].

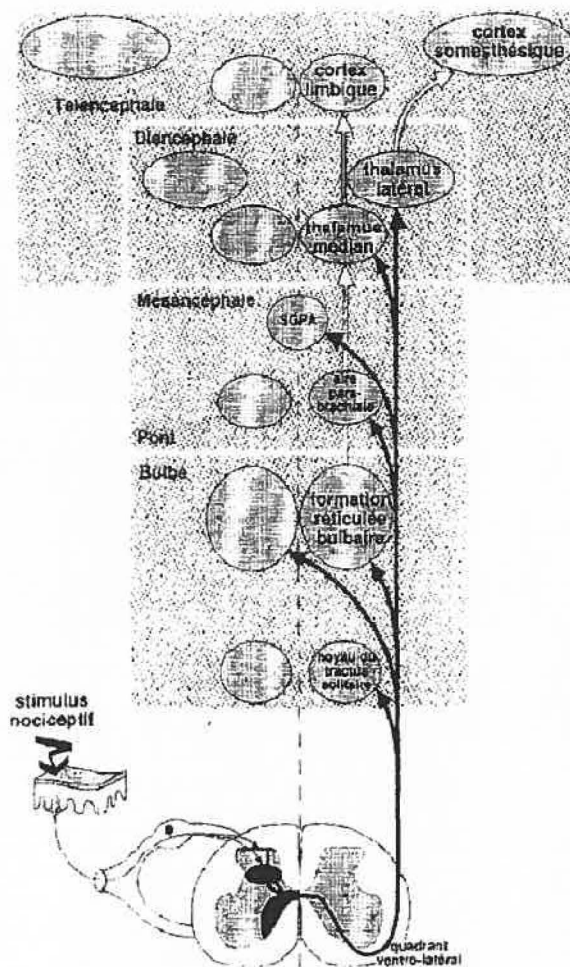
Les fibres afférentes primaires peuvent faire synapse avec deux types de neurones. Tout d'abord, les fibres afférentes primaires peuvent faire synapse avec un neurone de projection qui transportera ensuite l'information vers les centres supérieurs. Ou alors, les fibres afférentes primaires peuvent faire synapse avec un interneurone médullaire excitateur ou inhibiteur. Ce dernier transmettra l'information nociceptive soit à un neurone de projection de la voie ascendante, ou un motoneurone commandant des activités réflexes. L'influx nerveux se propage par la libération de neurotransmetteurs à la synapse. Ces neurotransmetteurs sont généralement des acides aminés excitateurs ou des neuropeptides. De plus, plusieurs molécules importantes

pour la transmission nociceptive, comme la dynorphine et l'enképhaline (agissant sur des récepteurs opioïdes), l'acide gamma aminobutyrique (GABA), l'acétylcholine, et l'adénosine, modulent les effets des neurotransmetteurs de la première synapse des voies nociceptives. Lors d'un événement nociceptif, l'arrivée du potentiel d'action à l'extrémité de l'axone induit l'activation de pompes calciques. L'entrée de Ca^{2+} dans la synapse provoque la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane, permettant ainsi la libération du/des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, principalement le glutamate, l'aspartate, la substance P et le CGRP.

Lorsque ces neurotransmetteurs se lient à leurs récepteurs au niveau de la membrane post-synaptique, il peut se produire deux types de réaction. La première est l'entrée d'ions (dans le cas de la liaison à un récepteur ionotropique), ce qui provoque la variation du potentiel de repos jusqu'à la dépolarisation du neurone secondaire. La deuxième est l'activation d'une cascade de seconds messagers (dans le cas de récepteurs métabotropiques), ce qui induit la phosphorylation de certaines protéines, ce qui provoque l'ouverture de canaux calciques, la production d'inositol triphosphate (IP3) ou de diacylglycérol (DAG) et finalement la transcription de certains gènes.

Lorsque les afférences nociceptives primaires relâchent les neurotransmetteurs, ils activent des neurones secondaires qui traversent la moelle par la commissure grise antérieure et forment la voie spinothalamique et spinoparabrachiale, toutes deux situées dans le quadrant antérolatéral controlatéral et montent aux centres supérieurs, vers le thalamus somatosensoriel et le tronc cérébral [Besson & Chaouch, 1987, Willis & Coggeshall, 1991]. Donc, les projections

supraspinales, visant la formation réticulée (de la médulla oblongata, responsable de la réponse végétative au stimulus nociceptif), le mésencéphale (amené à la substance grise périaqueducale (SGPA) et au noyau cunéiforme par les faisceaux spinaux mésencéphaliques) et le thalamus (ventropostérolatéral, spécifique au toucher et à la nociception) sont controlatéral au stimulus. Les neurones du thalamus font alors synapse avec un neurone tertiaire qui se projette vers le cortex somatosensoriel et vers le système limbique. Les voies rejoignant les centres supérieurs permettent l'intégration de l'information sur la qualité sensorielle de la douleur (localisation, durée, intensité) ainsi que la mise en place des différentes sphères de la douleur mentionnées plus tôt [Guirimand & Bars, 1996]. Toute information nociceptive subit les influences inhibitrices ou excitatrices des voies de contrôle de la douleur.



[Guirimand & Bars, 1996]

Figure 1. Voie ascendante de la douleur

L'influx nerveux est initié à la périphérie. Par la suite, il se propage jusqu'à la moelle épinière où il pénètre par les cornes dorsales. Les fibres afférentes sensorielles se terminent dans les lames supérieures et profondes de la moelle où elles font synapse avec un neurone secondaire projetant vers différentes régions des centres supérieurs. [Guirimand & Bars, 1996]

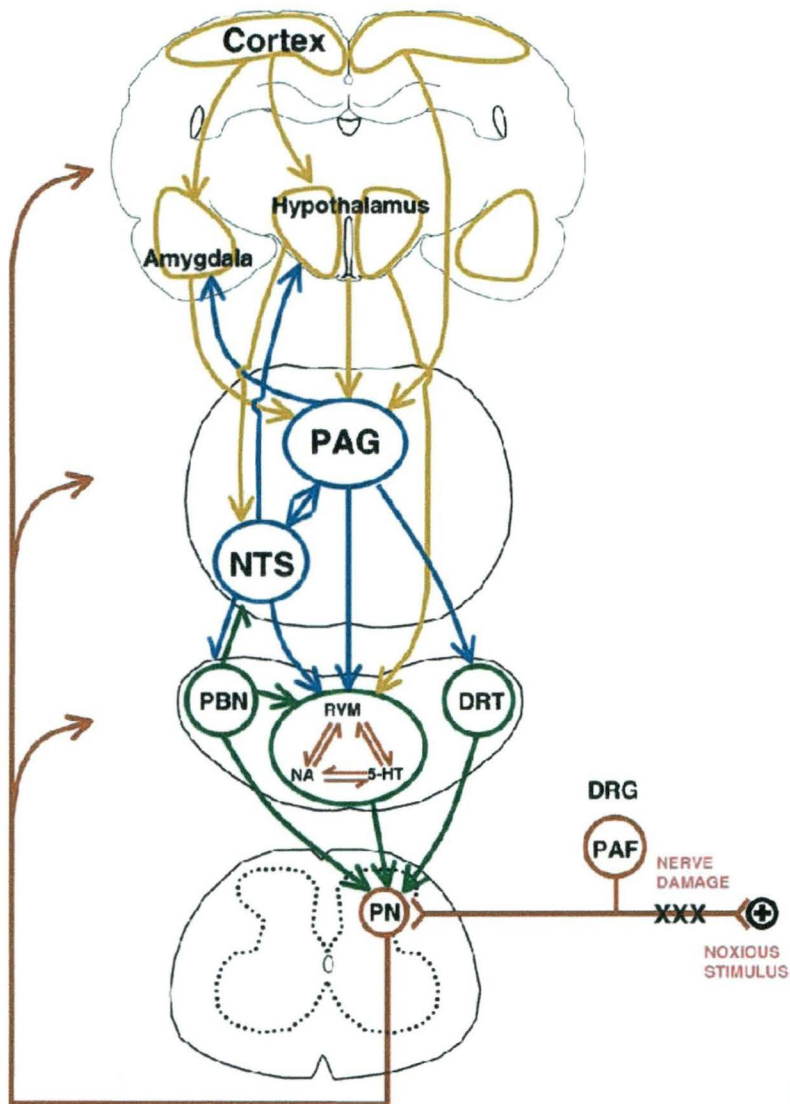
1.3 Mécanisme de la douleur : Les voies descendantes

La douleur est une sensation qui peut être modulée par différents paramètres environnementaux (affectif, socio-culturel, géographique) [Calvino & Grilo, 2006] et physiologiques (hormones,

stress, conditions pathologiques). Elles peuvent être inhibitrices ou facilitatrices [Gebhart, 2004], et sont dites descendante puisqu'elles sont initiées au niveau supraspinal, et qu'elles descendent par le funiculles dorsolatéral, dans le cas des influences inhibitrices, et par la partie ventrale/ventrolatérale de la moelle, dans le cas des influences facilitatrices [Urban & Gebhart, 1997, Zhuo & Gebhart, 1997, Zhuo & Gebhart, 1992, Zhuo & Gebhart, 1990]. La transmission de l'information nociceptive vers les centres supérieurs résulte du déséquilibre entre les voies excitatrices et les voies inhibitrices [Guirimand & Bars, 1996, Brasseur et al., 1997]. La modulation des signaux nociceptifs peut se produire à différents niveaux et peut être tonique ou déclenchée par une stimulation nociceptive (CIDN, contrôle inhibiteur diffus nociceptif) [Guirimand & Bars, 1996].

1.3.1 Mécanisme supraspinal

La substance grise périaqueducule (SGPA), particulièrement la partie ventrolatérale, ainsi que le noyau du raphé, situé dans la médulla rostroventrale, sont des éléments prédominants de la modulation de la douleur par la voie inhibitrice descendante [Yaksh & Rudy, 1978]. Cependant, il a été clairement démontré que des contrôles descendants étaient aussi produits par le cortex sensoriel, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale, le pont et la médulla [Yaksh & Kerr, 1986].



[Millan, 2002]

Figure 2. Voies descendantes de modulation de la douleur

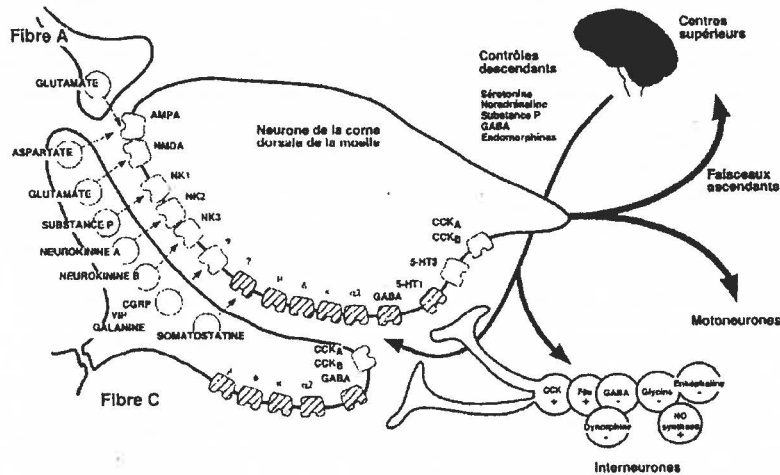
Vue schématique des voies descendantes de modulation de la douleur. Celles-ci sont initiées au niveau des structures cérébrales. Il est à noter que plusieurs régions du cerveau sont impliquées dans la modulation de l'information nociceptive, particulièrement la substance grise périaqueducule (PAG) et la médulla rostroventrale (RVM) qui sont des points convergents de ces mécanismes de modulation de la douleur.

La SGPA se projette non seulement vers le locus coeruleus, la formation réticulée médullaire et le noyau du raphé magnus (NRM), mais aussi vers le système limbique et le noyau thalamique intralaminaire [Cameron et al., 1995, Shah & Dostrovsky, 1980, Yeziarski et al., 1982, Bockstaele et al., 1991, Eberhart et al., 1985]. Ce sont ces régions qui se projettent vers la moelle par le funiculus dorsolatéral. Lors de l'activation de la SGPA, il y a activation de différents types de neurones. Ceux qui se rendent vers le NRM sont sérotoninergiques [Yeziarski et al., 1982]. Lors de la stimulation du NRM, les neurones en émergeant libèrent de la sérotonine au niveau de la moelle postérieure [Besson, 1990]. Le locus coeruleus, pour sa part, libère de la noradrénaline au niveau des cornes postérieures de la moelle où il existe des récepteurs adrénergiques particulièrement de type alpha 2 [Brasseur et al., 1997]. L'inhibition des neurones dorsaux par cette voie descendante peut se produire par la libération de différents neuromédiateurs, tels que la sérotonine et la noradrénaline telle que mentionnée plus haut, mais aussi par la libération de GABA, de glycine et de peptides opioïdes [Lin et al., 1996b, Lin et al., 1996a, Lin et al., 1996c, Peng et al., 1996a, Peng et al., 1996b, Peng et al., 1996c, Cui et al., 1999, Budai et al., 1998, Budai & Fields, 1998].

Cependant, il est important de savoir qu'il n'y a pas de séparation anatomique distinguant les contrôles inhibiteurs et les contrôles facilitateurs de la douleur. Bien souvent, une même stimulation d'une structure peut entraîner simultanément l'activation des contrôles inhibiteurs et facilitateurs puisqu'un même neurotransmetteur, dépendamment quel récepteur il active, pourra être excitateur ou inhibiteur [Millan, 2002].

L'inhibition et l'excitation par les centres supérieurs peut se produire à différents niveaux; premièrement, par l'action sur des récepteurs postsynaptiques, deuxièmement, par l'action sur certains interneurones médullaires influençant la transmission par les fibres afférentes primaires, et troisièmement, par l'action faite sur des récepteurs présynaptiques, permettant la modulation de la libération des neurotransmetteurs [Dickenson, 1993].

1.3.2 Mécanisme spinal



[Guirimand & Bars, 1996]

Figure 3. Modulation de la transmission spinale des signaux nociceptifs

Plusieurs neurotransmetteurs et neuromodulateurs sont impliqués dans les mécanismes d'inhibition spinale. Ces neurotransmetteurs et neuromodulateurs peuvent avoir des effets dépolarisants ou hyperpolarisants lors de leur liaison à leur récepteur. On note le rôle particulier des interneurones inhibiteurs et excitateurs modulant la transmission de l'information nociceptive.

La modulation des voies afférentes de la douleur au niveau spinal est mieux connue. Dès l'arrivée du signal dans la moelle épinière, les neurones afférents primaires sont modulés (activés ou inhibés) par les acides aminés excitateurs et les neuropeptides, particulièrement la

substance P et le CGRP. De plus, les signaux pénètrent dans la moelle et se dirigent vers les centres supérieurs en traversant un système d'interneurones qui peuvent être excitateurs (CCK, NO synthase) ou inhibiteurs (GABA, glycine, opioïde). Finalement, un des systèmes de contrôle inhibiteur largement discuté dans la littérature est le modèle du « gate control », ou théorie du portillon, présenté par Melzack et Wall en 1965. Il s'agit en fait, d'interneurones contrôlant l'équilibre entre les messages nociceptifs et non-nociceptifs présents dans les neurones nociceptifs non-spécifiques [Melzack & Wall, 1965]. Ils ont démontré que le recrutement de fibres A β permet l'activation d'interneurones inhibiteurs qui bloquent les informations nociceptives provenant d'un même segment de la moelle.

1.4 L'étude de la douleur

1.4.1 L'utilisation d'animaux en laboratoire

La souris est l'une des espèces les plus utilisées dans l'étude de la douleur. En comparaison avec le rat, l'avantage des modèles murins est la facilité à les modifier génétiquement. L'expérimentation sur les animaux dans l'étude de la douleur a débuté afin de pouvoir tester des stimuli plus intenses que chez l'humain et permettant de voir l'implication moléculaire de ces stimuli au niveau du système nerveux central. L'utilisation d'animaux en laboratoire a longtemps été controversée, cependant, cette pratique est maintenant balisée selon les critères du Conseil Canadien de protection des animaux (CCPA) se basant sur les principes proposés par Russel et Burch en 1959 (CCPA, Les trois R de l'expérimentation animale appropriées. Dans : Formation des utilisateurs d'animaux d'expérimentations. – Modules du tronc commun) qui propose le remplacement, la réduction et le raffinement afin de rendre éthiquement acceptable la

recherche chez les animaux et éviter les abus. Brièvement, cela signifie remplacer les animaux par un modèle autre lorsque possible; en utiliser le plus petit nombre nécessaire; et réduire la douleur à l'essentiel tout en considérant l'objectif de l'étude.

Puisque la douleur relève de la perception, elle est complexe à évaluer chez un animal. Leur douleur est mesurée uniquement à partir du comportement (il est impossible de l'évaluer de façon subjective comme chez l'humain), donc de façon indirecte. Le comportement, qu'il s'agisse du comportement animal ou humain, varie énormément en fonction de l'individu, de l'espèce ou de la race [Beaulieu, 2005]. De plus, les comportements des animaux sont fortement influencés par certains facteurs de l'environnement, tel que le rythme circadien, les conditions d'hébergement, la manipulation des animaux, l'ordre dans lequel les animaux sont testés et le manipulateur [Vissers et al., 2003].

Il faut être prudent en ce qui concerne la transposition des résultats de la souris à l'humain. Par exemple, le rôle du sexe dans l'analgésie provoquée par l'activation des récepteurs opioïdes est inversé entre les souris et l'humain. Chez l'humain, les femmes sont plus sensibles aux agonistes opioïdes spécifiques des récepteurs mu (MOR) et kappa (MOK) que les hommes. Chez les souris C57BL/6, les mâles sont plus sensibles à la morphine que les femelles [Craft, 2003]. Ceci n'est pas observable pour toutes les souches de souris, puisque dans plus de sept autres souches aucune différence entre les mâles et les femelles n'est notée [Kest et al., 1999]. De plus, ces variations dépendent également des tests auxquels les animaux sont soumis. Malgré cela, la

connaissance des contraintes et limites de nos sujets expérimentaux permet une meilleure compréhension et une meilleure analyse des résultats obtenus.

1.4.2 Le test à la formaline

Le test à la formaline est un test comportemental largement utilisé dans l'étude de la nociception. L'injection de formaline intraplantaire (formaldéhyde 1 à 10 % dans du NaCl 0,9 % [Rosland et al., 1990]), produit un comportement douloureux modéré et continu ressemblant davantage à une douleur clinique que les modèles de douleur aiguë, comme les tests de retrait de la queue ou de la plaque chauffante [Murray et al., 1988, Dennis & Melzack, 1980, Abbott et al., 1982]. Généralement, le comportement douloureux est quantifié selon une échelle pondérée, tel que décrit originalement chez le chat et le rat par Dubuisson et Denis (1977) :

0 = La souris ne démontre aucun signe de douleur vis-à-vis la patte injectée

1 = La souris démontre un faible comportement douloureux face à la patte injectée, c'est-à-dire que la souris met peu ou pas de poids sur la patte injectée, montre une réticence face à l'utilisation normale de sa patte.

2 = La souris démontre des signes clairs de douleur. La patte injectée est maintenue surélevée du sol. La souris se déplace sur trois pattes dans le but clair d'éviter la douleur. Il sera mentionné comme un comportement de « retrait », mais aussi comportement de « trépidement ».

3 = La souris lèche, mordille ou secoue la patte injectée dans le but clair de soulager la douleur. Ce comportement sera mentionné comme un comportement de « lèchement »

Plusieurs groupes divisent les comportements nociceptifs chez le rat en plusieurs comportements différents : [Tjolsen et al., 1992]

« retrait » ou « flexing » : soulèvement de la patte

« lèchement » et le « mordillement » ou « licking » et « biting »: lèchement et mordillement de la patte

« piétinement » ou « paw-jerking » : soulèvement répété en un court laps de temps

« trépidement » ou « flinching » : parfois décrit comme équivalent du comportement de « retrait », parfois décrit davantage comme un comportement de « piétinement » incluant certaines composantes de comportement de « shaking » (secouement de la patte)

De plus, d'autres comportements sont aussi quantifiés ou incorporés dans les scores nociceptifs comme les comportements de frottement de la figure, de redressement sur ses pattes arrières ainsi que d'exploration.

Le test se déroule généralement sur 60 minutes, les comportements sont notés en temps réel, ce qui permet de calculer la moyenne des scores nociceptifs en bloc de trois minutes $((\text{temps} \times 0) + (\text{temps} \times 1) + (\text{temps} \times 2) + (\text{temps} \times 3)) / 3$ minutes. Certains groupes modifient les poids associés à chacun des scores nociceptifs selon le type d'animal utilisé [Coderre et al., 1993]. D'autres mesurent uniquement le nombre de seconde passé en comportement de « trépidement » ou en comportement de « lèchement/mordillement » ou bien encore la fréquence de « piétinement » par bloc de 3 minutes. La façon de quantifier et d'analyser les résultats dépend en grande partie du type d'animal utilisé lors du test.

Il est aussi possible de diviser les comportements, soit « trépidement », « lèchement/mordillement », « piétinement », afin de tirer différentes conclusions. Ces comportements peuvent être associés à différents mécanismes neurophysiologiques, dont des mécanismes davantage spinaux (comportement de « trépidement » décrit d'avantage comme du « piétinement » puisque distinct du comportement de « retrait ») ou des mécanismes davantage suprapinaux (comportement de « lèchement ») [Ceccarelli et al., 2003]. Le comportement de « trépidement » est souvent le plus utilisé puisqu'il est beaucoup moins modulé par les composantes environnementales [Tjolsen et al., 1991a, Tjolsen et al., 1991b, Berge et al., 1991, Wheeler-Aceto & Cowan, 1991].

Chez la souris, la quantification et l'analyse se fait différemment puisque les comportements nociceptifs sont plus difficiles à quantifier dû à une vitesse de mouvement supérieure, mais plus stéréotypé [Tjolsen et al., 1992, Hunskar et al., 1985]. Donc, plusieurs équipes de recherche observent uniquement le comportement de « lèchement » et de « mordillement » plutôt que le score comportemental décrit par Dubuisson and Dennis (1977), puisqu'il est davantage caractéristique et consistant dans le temps [Hunskar et al., 1985, Hunskar & Hole, 1987, Murray et al., 1988, Sufka et al., 1998, Mogil et al., 1998]. La technique de scores nociceptifs présente beaucoup plus de variabilité [Murray et al., 1988]. Le comportement de « piétinement » (parfois présenté comme étant du « trépidement ») n'étant pas présent chez la souris [Sufka et al., 1998, Wilson & Mogil, 2001], il est très difficile de tirer des conclusions sur les régions sous-tendant des mécanismes associés à ces comportements (soit spinal ou supraspinal). De

plus, le comportement de « trépidement», chez la souris, dépend fortement de la température ambiante de la pièce. Les comportements de frottement du visage et de locomotion sont très peu corrélés avec l'index de nociception et d'antinociception chez la souris [Sufka et al., 1998].

Le test à la formaline est largement utilisé puisqu'il produit une réponse triphasique permettant l'observation de douleur aiguë, tonique, ainsi que du contrôle inhibiteur endogène de la douleur [Abbott et al., 1995, Tjolsen et al., 1992, Watson et al., 1997, Gaumond et al., 2002].

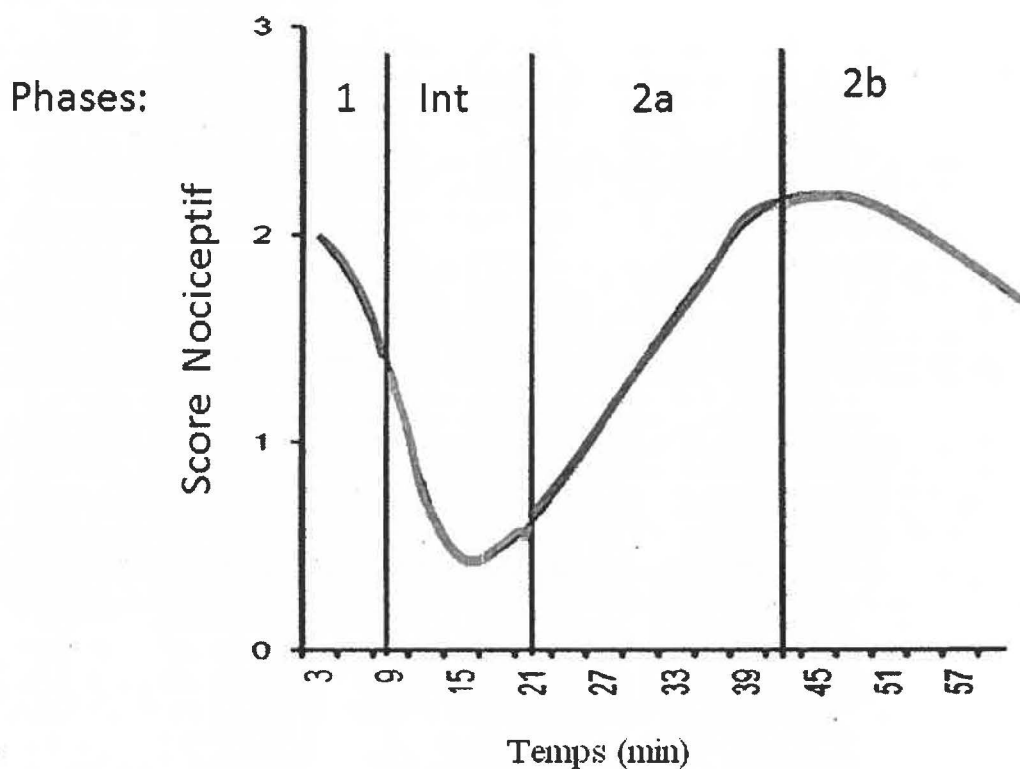


Figure 4. Graphique type de résultats de test à la formaline

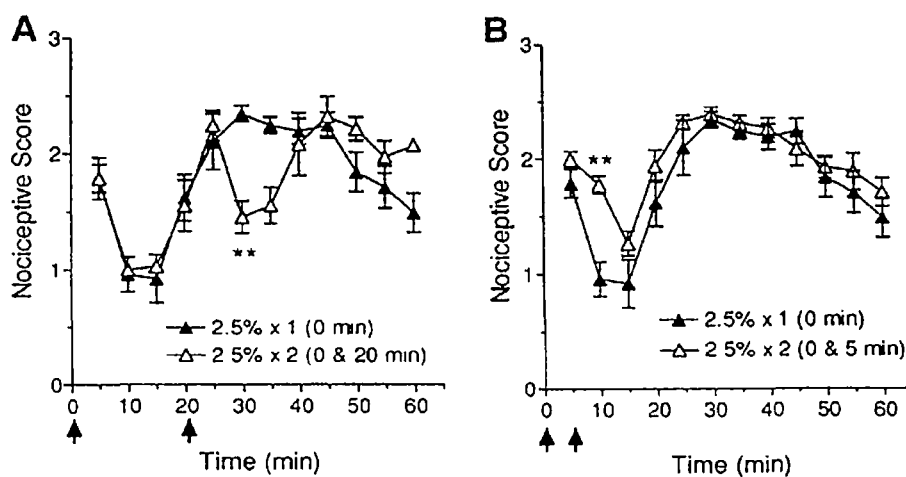
Représentation d'une courbe standard de test à la formaline avec description des différentes phases. 1 : phase 1; Int : Interphase; 2a : Phase 2a; 2b : Phase 2b [Spooner et al., 2007].

Il a été démontré que la phase 1, de l'injection à la 9^e minute, représente la période d'excitation des nocicepteurs cutanés provoquant l'activation des fibres C, donc d'une douleur aiguë [Tjolsen et al., 1992, Hunskaar & Hole, 1987]. Il a été démontré que l'injection de capsaïcine, qui produit une réduction des récepteurs vaniloïdes des fibres C [Jancso et al., 1977, Nagy et al., 1980, Nagy et al., 1981, Nagy et al., 1983], inhibe cette phase [Shibata et al., 1989].

La phase 2, mesurer à partir de la 18^e minute [Gaumond et al., 2002, Gaumond et al., 2005], serait plutôt reliée à une réaction inflammatoire au niveau des tissus périphériques [Tjolsen et al., 1992, Hunskaar & Hole, 1987, Hunskaar et al., 1986, Shibata et al., 1989, Shibata et al., 1986, Dubuisson & Dennis, 1977]. Il a été démontré que plusieurs anti-inflammatoires, sélectifs et non-sélectifs des cyclo-oxygénase-2 (COX-2), produisent une atténuation du comportement de « trépidement » [Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 2002, Veiga et al., 2004, Torres-Lopez et al., 2002, Ochi et al., 2000]. Cette phase peut aussi être causée par une sensibilisation spinale suite à l'excitation des fibres C ainsi qu'aux changements fonctionnels présents dans la corne dorsale s'en découlant [Yashpal &Coderre, 1998, Yashpal et al., 1996, Dickenson & Sullivan, 1987, Vaccarino & Melzack, 1989, Winter et al., 1962].

Récemment, Spooner et al. (2007), suite à des mesures de nociception chez les souris ER β KO, ont observé une variation de la réponse nociceptive associée au test à la formaline lors de la phase 2 précoce et tardive du test à la formaline. Ils suggèrent un possible effet de l'estrogène sur la phase 2 précoce (phase 2a) possiblement associé à une prolongation des mécanismes de l'interphase, ou bien un effet particulier sur la réponse inflammatoire et la sensibilisation spinale. Puisque le projet de recherche présenté ci-dessous s'intéresse aussi à la relation entre les récepteurs estrogéniques sur la modulation de la douleur associée au test à la formaline, nous avons aussi décidé d'observer les variations possibles durant la phase 2 en divisant celle-ci de la même façon que Spooner et al. (2007).

L'interphase, décrite entre la phase 1 et la phase 2 (mesuré entre la 9^e à la 18^e minute par Gaumond et al., (2002;2005))[Gaumond et al., 2002, Gaumond et al., 2005, Spooner et al., 2007], a longtemps été considérée comme une phase d'inactivité [Puig & Sorkin, 1996, McCall et al., 1996]. Cependant, James Henry a démontré (1999) que l'interphase sous-tendait un processus d'inhibition active de la douleur [Henry et al., 1999].



[Henry et al., 1999]

Figure 5. Démonstration de l'interphase.

Ces résultats démontrent que lors de la seconde injection de formaline après 20 minutes de la première, une réponse triphasique se produit. Une seconde diminution de la réponse nociceptive se produit après 10-15 min de la seconde injection.

Ces résultats lui ont permis de déterminer, premièrement que la diminution observée lors de l'interphase est bel et bien un mécanisme d'inhibition actif (confirmé par électrophysiologie), qu'elle est complète après une seule injection de formaline et que cette phase peut inhiber complètement une phase nociceptive. Deuxièmement, l'inhibition ne requiert pas un axe neural

intact, puisqu'il a observé une réponse biphasique nociceptive chez les rats spinalisés. Finalement, l'inhibition n'est pas régulée par un mécanisme GABAergique puisqu'elle est présente sous anesthésie au pentobarbital [Henry et al., 1999].

Par la suite, plusieurs équipes de recherche ont continué à explorer les mécanismes d'action reliés à l'interphase. Entre autres, il a été démontré que les hormones sexuelles modulent particulièrement cette phase d'inhibition active [Gaumond et al., 2002, Gaumond et al., 2005], ce qui rend le test à la formaline très pertinent dans l'étude du rôle des hormones sexuelles dans la douleur. Une étude particulièrement intéressante a été effectuée dans le but de déterminer le mécanisme sous-tendant l'interphase, ainsi que la différence entre les mâles et les femelles. Gaumond et ses collaborateurs [Gaumond et al., 2007] ont injecté des antagonistes sélectifs (intra-péritonéale) et non-sélectifs (intra-péritonéale et intra-thécale) des récepteurs opioïdiques. Ils ont observé un blocage prédominant de l'interphase par la naloxone, spécifiquement chez les femelles. Ceci suggère que l'interphase implique davantage des systèmes opioïdes chez la femelle, et non-opioïdiques chez le mâle. De plus, seule la combinaison des antagonistes pour les récepteurs kappa et delta opioïdes produit un blocage significatif de l'interphase chez les femelles.

L'interphase, décrite entre la 9^e et la 18^e minute par Gaumond et al. (2002;2005) [Gaumond et al., 2002, Gaumond et al., 2005, Spooner et al., 2007], est donc considéré comme étant un mécanisme d'inhibition actif de la douleur [Henry et al., 1999]. De plus, Gaumond et al. (2002;2005) ont démontré que cette section est particulièrement impliquée dans les différences

entres les mâles et les femelles [Gaumond et al., 2002] ainsi que lors de l'étude de l'influence des hormones gonadiques dans les mécanismes de modulation de la douleur [Gaumond et al., 2005]. Cette même division a été réutilisée lors de l'étude de la réponse nociceptive associée au test à la formaline chez les souris ER β KO [Spooner et al., 2007]. Cependant, tout comme les méthodes d'analyse du comportement, au cours des années, le test à la formaline a été divisé de différentes façons par les divers groupes de recherche. Puisque le projet de recherche présenté ci-dessous s'intéresse au rôle des récepteurs estrogéniques sur la modulation de la douleur associée au test à la formaline, nous avons décidé d'utiliser les mêmes divisions que Gaumond et al. (2002;2005).

CHAPITRE 2 : LES HORMONES SEXUELLES

2.1 Les hormones sexuelles

2.1.1 Les hormones

Les hormones sont des molécules sécrétées par une glande endocrine en réponse à une stimulation. Le rôle des hormones est de transporter un message d'une cellule à une autre. Cette substance peut avoir un effet autocrine, c'est-à-dire sur la cellule qui la produit, ou paracrine, sur une autre cellule. Les hormones sont transportées par le sang, généralement liées à une molécule de transport, ou bien de façon libre jusqu'à l'organe cible. Ces substances modulent le fonctionnement du corps entier, y compris le SNC, où elles régulent particulièrement le comportement, les fonctions cognitives, l'humeur, l'appétit, l'apprentissage, la mémoire et les activités sexuelles. Les hormones présentes au niveau du SNC (des neurohormones) sont en relation très proche avec la production et la libération des neurotransmetteurs [Goodman et al., 2001, Greenspan & Gardner, 2004]. En effet, lorsque les hormones neuronales activent leurs cibles, elles provoquent la libération de neurotransmetteurs. Les neurotransmetteurs se distinguent des neurohormones par leurs poids moléculaires ainsi que leurs durées et leurs cibles d'action.

2.1.2 Les hormones stéroïdiennes

Les hormones sexuelles font partie de la famille des hormones stéroïdiennes. Tous les stéroïdes sont dérivés de la prégnénolone et possèdent une structure de base composée de quatre anneaux qui sont désignés par les lettres A-D [Greenspan & Gardner, 2004].

développement des caractéristiques sexuelles. Les hormones sexuelles chez la femelle sont produites par les ovaires en réponse à la signalisation par certaines hormones comme la FSH (« follicle-stimulating hormone ») et la LH (« Luteinizing-hormone »). En effet, les hormones FSH et LH augmentent le nombre de récepteurs aux LDL à la surface de la cellule, ce qui majore l'influx de cholestérol. Le cholestérol est transporté à travers le cytoplasme par la protéine SCP-2 (« Sterol carrier protein-2 ») jusqu'à la mitochondrie. L'enzyme StAR (« Steroidogenic Acute Regulator ») régule et permet l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie. Il s'agit de l'étape limitante de la synthèse des stéroïdes. La conversion du cholestérol en prégnénolone (par la P450_{scc}) se fait à l'intérieur de la mitochondrie. Une fois la prégnénolone produite, elle est transformée en diverses hormones par les enzymes de la stéroïdogénèse. Les hormones produites au final dépendent de l'organe et du type cellulaire dans lequel l'hormone est produite et sécrétée.

2.2 L'estrogène

La synthèse des estrogènes produit trois molécules distinctes, soit l'estradiol, l'estriol et l'estrone. L'estradiol et l'estrone sont produits par la voie de synthèse présentée à la figure 6, tandis que l'estriol est produit uniquement durant la grossesse. L'estriol est une molécule dérivée du 16-OH-DHEAS synthétisée par le placenta. Les estrogènes sont de stéroïdes à 19 carbones dont l'anneau A est aromatisé. Ces hormones sexuelles sont produites de façon majoritaire par les follicules des ovaires, le corps jaune et le placenta, mais aussi, en plus petite quantité, par le foie, la surrénale, les seins et le tissu adipeux. [Greenspan & Gardner, 2004]

2.2.1 Biosynthèse

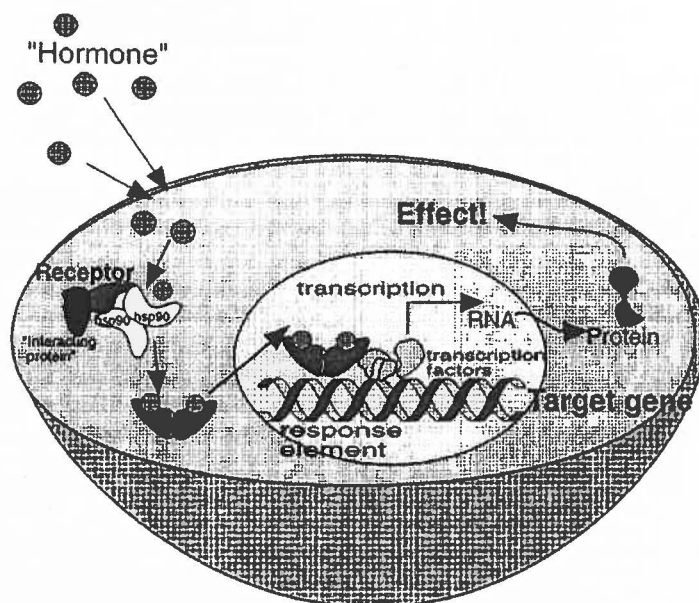
La biosynthèse des estrogènes, comme les autres hormones sexuelles, se produit par la modification de cholestérol par différentes enzymes. De façon plus spécifique, les estrogènes sont produits à partir de l'androstènedione ou de la testostérone (d'où la synthèse d'estrogène chez l'homme). L'aromatase CYP19 permet l'aromatisation de l'anneau A par l'utilisation de NADPH et d'oxygène moléculaire comme co-substrat [Goodman et al., 2001]. Les protéines nécessaires à la synthèse des estrogènes sont présentes au niveau du réticulum endoplasmique des cellules granulosées des ovaires, des cellules testiculaires Sertoli et Leydig, des cellules stromales des tissus adipeux, des syncytiotrophoblastes placentaires, des blastocytes de pré-implantation, des os et de différentes régions du cerveau [Simpson et al., 1999].

2.2.2 Le rôle des estrogènes

Les estrogènes ont une fonction neuroendocrine impliquée dans le contrôle de l'ovulation, du cycle menstruel et de l'implantation de l'ovule [Goodman et al., 2001]. L'estrogène module aussi le développement du système nerveux central, ainsi que l'homéostasie osseuse, du système cardio-vasculaire, du foie et des tissus adipeux. Il a particulièrement une action sur la synthèse des glucides, des protéines, ainsi que sur le métabolisme des lipides [Grumbach & Auchus, 1999].

2.2.3 Le mécanisme d'action de l'estrogène

Les estrogènes étant des molécules lipophiles, elle pénètre dans la cellule par diffusion passive ou facilitée. Au niveau du cytoplasme et du noyau, les molécules d'estrogène se lient à ses récepteurs ($ER\alpha$ et $ER\beta$), que l'on dit nucléaires (il existe aussi d'autres types de récepteur qui seront décrits plus loin), qui à l'état basal sont sous une forme apoprotéique inactive [Hrabovszky et al., 1998, Honjo et al., 1989, Migliaccio et al., 1998, Herbison & Theodosis, 1992]. La liaison avec l'estrogène permet de libérer le récepteur, ce qui permet à l'association estrogène/récepteur de former un dimère avec un second complexe estrogène/récepteur et de migrer jusqu'à l'intérieur du noyau. L'assemblage de ces molécules lie l'ADN au niveau de l'élément de réponse à l'estrogène (ERE) ce qui lui permet de recruter un complexe de coactivateurs formé du « cointegrator-associated protein-p 160 » ou s'associe à l'hétérodimère Fos/Jun qui se lie par la suite à l'AP1 (« Activator Protein ») [Webb et al., 1999]. Ces liaisons interagissent avec certains co-activateurs [Hall et al., 2002, McDonnell et al., 2002] ce qui permet la modulation de la transcription de certains gènes effecteurs [Paech et al., 1997, Jensen & DeSombre, 1973]. En résumé, en présence d'estrogène, les éléments de réponses ERE (par le complexe estrogène/ER, AP-1 (par le dimère Fos/Jun), SRE (par le « serum response factor Elk-1 », phosphoryler par MAPK/ERK) et CRE (par la protéine CREB phosphorylée par la cascade impliquant la PKA) sont reconnus par des protéines spécifiques permettant la transduction du signal et donc l'effet de l'hormone.



[Kuiper et al., 1998]

Figure 7. L'action d'un estrogène sur une cellule cible : voie classique.

La liaison d'une molécule d'estrogène à ses récepteurs nucléaires est décrite comme la voie classique ou génomique. Elle provoque l'effet en plusieurs heures. De plus, une voie d'activation à action rapide (seconde/minutes) est décrite depuis quelques années. Cette voie dite non-génomique puisqu'elle activerait des récepteurs membranaires couplés à une protéine G, résultant en une cascade de seconds messagers [Raz et al., 2008].

La découverte de la voie non-classique suggère un tout autre aspect de l'estrogène, principalement au niveau du système nerveux central, où l'on croit que ce phénomène est très présent. Les récepteurs localisés à la membrane auraient un rôle important dans la modification de l'excitabilité neuronale et qui se produirait très rapidement [Ronnekleiv & Kelly, 2005, Pietras & Szego, 1977, Kelly et al., 1977]. Entre autres, plusieurs études ont démontré la présence des récepteurs $ER\alpha$ et $ER\beta$ à la membrane activant par la suite une cascade de kinases régulant diverses fonctions [Raz et al., 2008].

2.2.4 Les récepteurs estrogéniques

Les récepteurs estrogéniques sont présents au niveau du SNC au sein de multiples régions. Ils sont aussi exprimés dans la moelle épinière, particulièrement au niveau de la couche II de la partie lombosacrée, ainsi qu'autour du canal central [Amandusson et al., 1995, Pfaff & Keiner, 1973].

2.3 Les sous-récepteurs estrogéniques

Comme mentionné plus haut, il existe deux formes prédominantes du récepteur estrogénique, soit ER α et ER β . Ces récepteurs proviennent de gènes distincts partageant cependant une certaine homologie. Malgré la similarité de ces gènes, les sous-récepteurs estrogéniques diffèrent dans leurs propriétés de transactivation [Paech et al., 1997] et leur affinité pour différents composés [Pettersson & Gustafsson, 2001].

Les sous-récepteurs ER α et ER β sont exprimés de façon variable dans les différents organes et tissus du corps. L'expression du récepteur ER α est prédominante dans l'utérus, les testicules, l'hypophyse, les ovaires, les reins, l'épididyme et la glande surrénale. Le récepteur ER β est plutôt exprimé dans la prostate, les ovaires, les poumons, la vessie, le cerveau, les os, l'utérus et les testicules [McEwen & Alves, 1999]. Par contre, les deux récepteurs sont présents au niveau du système nerveux central. Ils ont des distributions distinctes dans plusieurs régions [Shughrue et al., 1997], alors qu'ils sont co-exprimés dans d'autres. Ceci leur confère des rôles complémentaires et souvent non-redondants [Toran-Allerand, 2004, Filardo, 2002, Kuiper et al., 1997].

2.3.1 Le sous-récepteur alpha

L'infertilité présente chez les souris ER α KO (dont le gène produisant le récepteur ER α a été invalidé ou « knocked »), ainsi que son comportement sexuel anormal [Ogawa et al., 1998a, Ogawa et al., 1998b] a permis de déterminer que le récepteur ER α est essentiel à la fonction reproductive [Hewitt & Korach, 2003]. Le récepteur ER α est sensible aux variations d'hormones gonadiques dans le corps et son expression varie en fonction du cycle menstruel et au cours de la gestation [Papka et al., 2002]. De façon générale, dans le système nerveux central (particulièrement dans le « medial preoptic area » (MPOA), le « Bed Nucleus of the Stria Terminalis » (BNST), le « ventromedial hypothalamus » (VMH) et le « Arcuate Nucleus » (ARC)), l'expression du récepteur ER α est augmentée lors du retrait d'hormones stéroïdiennes (gonadectomie) et est diminuée lors d'une supplémentation en estrogène [Yuri & Kawata, 1991, Simerly & Young, 1991, Osterlund et al., 1998, Lauber et al., 1991, Koch, 1990, Handa et al., 1996, DonCarlos et al., 1995, Shughrue et al., 1992].

2.3.2 Le sous-récepteur bêta

Comparativement au récepteur ER α , le récepteur ER β n'est pas essentiel à la reproduction. Les femelles ER β KO ont une fonction ovulatoire très réduite, mais certains groupes ont noté une certaine fertilité [Hewitt & Korach, 2003]. Parmi les fonctions postulées du récepteur ER β , plusieurs études ont documenté un rôle dans le développement du cerveau et la différenciation neuronale, par la modulation de l'élongation des neurites [Krezel et al., 2001, Patrone et al.,

2000]. Ce récepteur est aussi responsable de plusieurs comportements non reproducteurs, particulièrement l'anxiété, l'apprentissage spatial et la dépression [Lund et al., 2005].

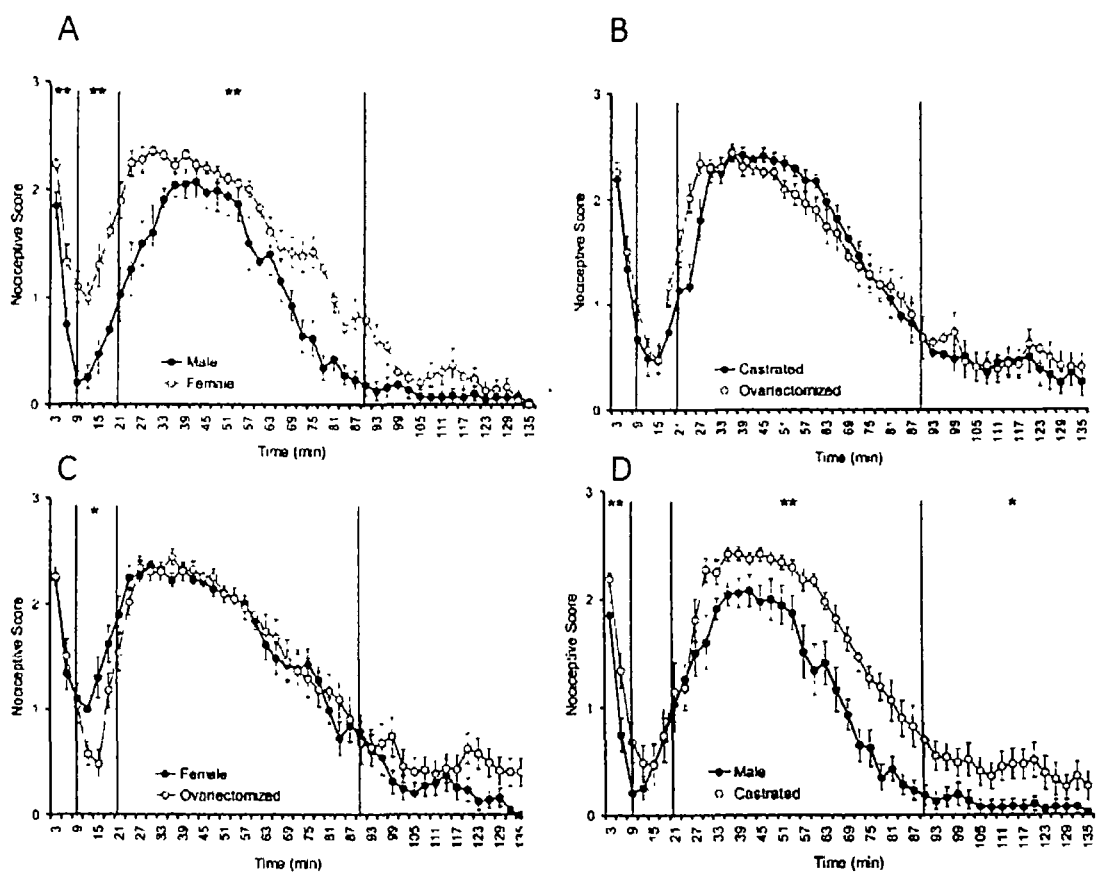
Le récepteur ER β est localisé dans diverses régions du cerveau, particulièrement le cortex cérébral [Mitra et al., 2003], mais aussi le noyau du raphé magnus. Il a même été démontré que dans le NRM, le récepteur ER β se colocalise avec 90% des cellules produisant la tryptophane hydroxylase (TPH), l'enzyme limitant dans la production du 5-HT (5-hydroxytryptamine). Cette co-localisation est beaucoup plus franche que celle observée pour le récepteur ER α . De façon intéressante, l'enzyme TPH est présente en quantité plus faible chez les souris ER β KO. Ces données suggèrent fortement un rôle du récepteur ER β dans la régulation de la production de neuromodulateurs, et donc de certains comportements [Nomura et al., 2003].

En plus, il a été observé que le récepteur ER β est présent aussi au niveau du noyau paraventriculaire (PVN), du noyau supraoptique (SON), de la substance noire et du cervelet. Le récepteur modulerait l'expression d'hormone comme l'oxytocine (OT) et la vasopressine (AVP) par son activation dans des régions spécifiques au niveau du PVN et du SON [Hrabovszky et al., 1998, Alves et al., 1998a, Mitra et al., 2003]. Ces modulations neuroendocriniennes suggèrent l'implication de ce sous-récepteur dans certaines fonctions comme l'apprentissage, la mémoire, le stress, l'osmorégulation et la locomotion [Shughrue & Merchenthaler, 2001]. L'expression du récepteur ER β au niveau du cerveau, tout comme celle du récepteur ER α , serait aussi régulée par les différentes hormones gonadiques circulantes [Isgor et al., 2002].

CHAPITRE 3 : RÉCEPTEURS ESTROGÉNIQUES ET DOULEUR

3.1 Différence de perception de la douleur entre les mâles et les femelles

Plusieurs études ont démontré que la douleur est perçue différemment entre les hommes et les femmes [Fillingim & Gear, 2004]. En plus de la perception de la douleur, l'analgésie provoquée par certains agents pharmacologiques serait différente entre les hommes et les femmes [Mogil et al., 2003]. En plus de cette variation inter-genre, la douleur varie au cours de la vie des femmes. La perception de la douleur n'est pas la même lorsque l'on compare des jeunes filles pré-pubères à des femmes. De plus, à plus petite échelle, il a été rapporté que la perception de la douleur varie à travers le cycle menstruel [Riley et al., 1999, Fillingim et al., 1997, Berkley, 1997]. Finalement, les travaux de Gaumond et al. faits chez le rat ont permis de mettre en évidence l'implication des hormones sexuelles dans la modulation de la douleur lors du test à la formaline.



[Gaumond et al., 2002]

Figure 8. Comparaison de la réponse nociceptive au test à la formaline entre les mâles et les femelles

Gaumond et al ont observé que la douleur produite par le test à la formaline est différente entre les mâles et les femelles (A). Les hormones sexuelles semblent être la cause de cette différence, puisque lorsque les mâles sont castrés et que les femelles sont ovariectomisées les réponses nociceptives sont identiques (B). Finalement, ils ont pu démontrer que les hormones sexuelles présentes chez la femelle augmentent la réponse nociceptive durant l'interphase du test à la formaline (C) tandis que les hormones sexuelles présentes chez le mâle diminuent la douleur (D).

3.2 L'estrogène dans la douleur

3.2.1 Impact des hormones sexuelles sur les neurotransmetteurs et leurs récepteurs impliqués dans la douleur

Les estrogènes, principalement, de même que la progestérone, modifient l'expression de plusieurs gènes associés au métabolisme de la sérotonine au niveau du NRM et de la SGPA, tels que 5HT_{2A}R [Sumner & Fink, 1997, Sumner & Fink, 1998], le transporteur de la sérotonine (SERT) présynaptique [McQueen et al., 1997] et VMAT2 [Rehavi et al., 1998]. Plusieurs études ont démontré qu'une supplémentation en estrogène chez des souris ovariectomisées augmente la synthèse et la récupération de la sérotonine. L'inverse se produit lors du retrait de l'estrogène [Biegon et al., 1983, Munaro, 1978, Ladisich, 1974, King et al., 1986, Johnson & Crowley, 1983], Di [Paolo et al., 1983, Crowley et al., 1979, Cone et al., 1981, Chomicka, 1986, Evrard, 2006]. Puisque la sérotonine est un médiateur important de la voie inhibitrice descendante de la douleur, une synthèse plus importante pourrait augmenter l'activité de cette voie.

L'estrogène influence aussi les neurones contenant l'acide gamma aminobutyrique (GABA). En effet, l'estrogène permet la diminution du glutamate décarboxylase (GAD) [McEwen & Alves, 1999], l'enzyme permettant la synthèse du GABA, au niveau de certains noyaux des centres supérieurs. Lorsque le GABA se lie à son récepteur, il en résulte l'ouverture de canaux ioniques permettant l'entrée d'ions chlore dans la cellule. Puisque les ions chlores sont des charges négatives, cette action provoque un changement dans le potentiel transmembranaire du neurone. Cette capacité d'hyperpolariser les cellules neuronales lui octroie une fonction inhibitrice [Aloisi, 2003, Rudick & Woolley, 2000, Murphy et al., 1998]. Puisque l'estrogène a un effet

inhibiteur de l'activité GABAergique, la résultante est une augmentation de la transmission au niveau des centres supérieurs.

3.2.2 Impact de l'estradiol sur les peptides opioïdes et leurs récepteurs

De nombreuses évidences démontrent une modulation par l'estradiol des voies de signalisation opioïdiques. En effet, l'estradiol provoque l'augmentation de la libération de peptides opioïdes dans le SON de l'hypothalamus des femelles rates [Sinchak & Micevych, 2001, Micevych et al., 2003], donc provoquerait de l'anti-nociception à court terme. Lors de la liaison du peptide à un récepteur opioïde, il y a internalisation du récepteur à l'intérieur de la cellule. Suite à l'activation des récepteurs opioïdes, une boucle de rétro-contrôle inhibitrice permet la modification de la densité des récepteurs opioïdes de type mu (MOR) à la surface de la cellule, ce qui entraîne d'une part une diminution de l'efficacité des peptides opioïdes et d'une autre part une diminution de l'efficacité des contrôles impliquant ces voies d'activation, donc une augmentation de la douleur perçue. Bref, l'estradiol affecte donc, par la modulation de la libération de peptides opioïdes, la densité des récepteurs opioïdes de l'hypothalamus chez les rats [Amandusson et al., 1999, Micevych & Sinchak, 2001, Micevych et al., 1997].

Par la suite, de nombreuses études ont rapporté que l'estradiol supprime l'inhibition provoquée par les récepteurs MOR sur les neurones β -endorphines [Schwarz & Pohl, 1994, Weiland & Wise, 1990, Kelly et al., 1992, Quinones-Jenab et al., 1997, Micevych et al., 1997, Lagrange et al., 1995, Eckersell et al., 1998, Brown et al., 1996].

Finalement, un effet important de l'estradiol dans l'expression du gène de l'enképhaline a été observé [Holtzman et al., 1997, Sinchak et al., 2000]. En fait, l'administration d'un bolus d'estradiol chez des rates ovariectomisées produit une augmentation de la production d'enképhaline dans la moelle épinière [Amandusson et al., 1996, Amandusson et al., 1999].

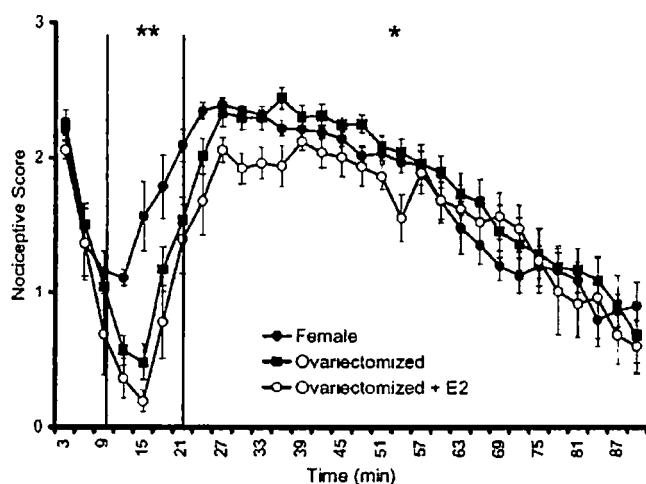
Bref, un niveau élevé d'estrogènes est associé à une grande activation de la neurotransmission associée à la libération d'opioïdes, donc un effet anti-algésique, tandis que des niveaux estrogéniques bas diminuent la signalisation par les peptides opioïdes, particulièrement au niveau du thalamus, du noyau accumbens et des amygdales, donc un effet pro-algésique. Ces modulations corrélaient très bien avec les réponses psychophysiologiques rapportées par les patients [Smith et al., 2006].

3.2.3 Démonstration expérimentale du rôle de l'estrogène sur la modulation de la douleur

Expérimentalement, plusieurs études ont démontré la modulation par l'estrogène de l'activation et de l'inhibition de la douleur. Tout d'abord, Mannino et ses collaborateurs ont démontré l'effet de différentes concentrations de 17- β -estradiol sur le comportement nociceptif de rat durant le test à la formaline. Ils ont aussi démontré que le 17- β -estradiol produit une hypoalgésie durant la phase 2 du test à la formaline. Par la suite, Gaumond et collaborateur [Gaumond et al., 2005] ont évalué l'implication des différentes hormones sexuelles chez des rats gonadectomisés. Ces résultats lui ont permis de confirmer que le 17- β -estradiol a un effet antihyperalgésique principalement au niveau de la phase 2 du test à la formaline. De plus, cette même étude a

permis de démontrer que la combinaison estradiol et progestérone est nécessaire pour produire l'hyperalgésie durant l'interphase du test à la formaline chez les souris femelles.

Cet effet de l'estradiol sur la phase 2 du test à la formaline peut s'expliquer par la présence des récepteurs estrogéniques ($ER\alpha$ et $ER\beta$) dans les organes associés au système immunitaire tout particulièrement le thymus, la rate et la moelle osseuse. Ces organes, activés par l'estradiol, contribueraient à l'inflammation induite par les granulocytes, la prolifération des lymphocytes T, la suppression de la cytotoxicité associée aux cellules NK et à la suppression des lymphocytes B. [Craft et al., 2004] La modulation de la libération de ces éléments serait associée aux effets anti-inflammatoires de l'estrogène [Kuba et al., 2005], cependant il a été démontré que cet effet anti-inflammatoire est particulièrement associé au récepteur $ER\beta$ [Catley et al., 2008, Cvorovic et al., 2008]].



[Gaumond et al., 2005]

Figure 9. Modulation du comportement nociceptif associé au test à la formaline selon le status hormonal

Le traitement à l'estradiol (E2) d'une rate ovariectomisée produit une diminution de la réponse nociceptive durant la phase 2 du test à la formaline

D'autres études ont déterminé que la différence majeure entre la réponse nociceptive des femelles ovariectomisées (OVX) et celle des femelles intactes (INT) est le circuit neuronal emprunté par l'information nociceptive. Les rates OVX ont une tendance à être plus longtemps en stade 3 (comportement de « lèchement ») plutôt qu'en stade 2 (comportement de « trépidement ») en comparaison aux rates INT. Ce comportement serait davantage associé à des circuits supraspinaux plutôt que spinaux [Ceccarelli et al., 2006]. Cette augmentation de la transmission nerveuse au niveau supraspinal a aussi été observée chez des mâles auxquels de l'estrogène a été injecté pendant deux jours. Cette augmentation était complètement réversible par la naloxone, ce qui suggère l'implication de systèmes opioïdiques [Craft et al., 2004, Ceccarelli et al., 2004, Aloisi & Ceccarelli, 2000]. Ces variations de réponse comportementale

peuvent être associées à la grande distribution des récepteurs gonadiques, particulièrement des récepteurs estrogéniques, dans certaines régions des centres supérieurs associés à la modulation de la douleur comme l'hypothalamus, l'amygdale, la substance grise périaqueducale (SGPA) et le noyau du raphé dorsal [Craft et al., 2004]. Ces régions influencent particulièrement l'intégration de l'information nociceptive, ainsi que les contrôles inhibiteurs descendants [Craft, 2007].

Ces expérimentations démontrent l'importance d'étudier précisément les différents types de comportements nociceptifs associés au test à la formaline. De plus, l'étendue des résultats portant sur l'action des estrogènes dans la douleur rend pertinente la caractérisation du rôle spécifique des récepteurs estrogéniques α et β dans la douleur.

3.3 Le récepteur ER α dans la douleur

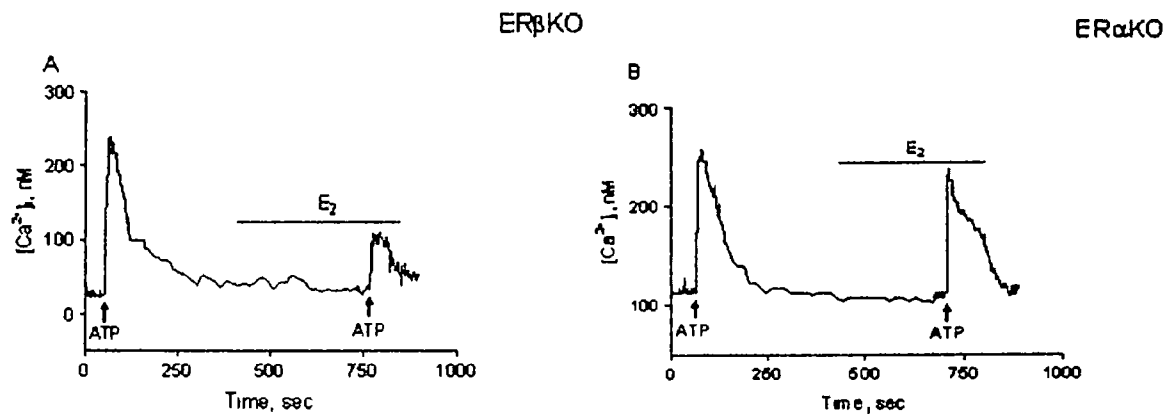
Comme mentionné plus haut, le principal rôle du récepteur ER α est dans la fonction reproductive. Cependant, quelques indices permettent de croire qu'il serait aussi impliqué dans la modulation de la douleur.

Premièrement, l'étude de la distribution du récepteur ER α dans le SNC révèle sa localisation dans plusieurs zones topographiques importantes dans la douleur. On retrouve ce récepteur de façon prédominante dans les couches 1 et 2 de la moelle épinière [Papka et al., 2002]. Il s'agit de zones spécifiques où les fibres afférentes nociceptives pénètrent dans la moelle épinière. De plus, le récepteur ER α est présent au niveau de la SGPA, un des centres, situé dans le tronc

cérébral, essentiels au contrôle inhibiteur descendant de la douleur [Vanderhorst et al., 2002] et qui se projette vers le NRM et la moelle épinière. Une autre implication du récepteur ER α dans la modulation de la douleur est par l'intermédiaire des interneurons inhibiteurs. En effet, il a été démontré qu'il est exprimé dans les noyaux de certains interneurons GABAergiques [Milner et al., 2001] et qu'il pourrait avoir un rôle dans la diminution de l'activité GABAergique de ces neurones [McEwen et al., 2001]. Finalement, le récepteur ER α est colocalisé dans certains neurones produisant la préproenképhaline dans la moelle épinière de rat [Amandusson et al., 1999, Amandusson et al., 1996, Mogil et al., 1993], un précurseur de l'enképhaline, un peptide opioïde très important. Cette localisation particulière est prédominante dans les couches superficielles de la corne dorsale.

Plus tôt, il a été mentionné que l'estradiol est impliqué considérablement dans la modulation du système opioïdérique. Entre autres, qu'il produisait l'internalisation des récepteurs MOR dans le système limbique hypothalamique due à une augmentation de la libération de peptides opioïdes endogènes [Micevych et al., 2003, Eckersell et al., 1998]. Micevych et al. (2003) ont démontré que cette internalisation du récepteur MOR par l'estrogène a lieu chez les souris sauvage (WT) et chez les souris ER β KO, mais pas chez les souris ER α KO, ce qui démontre la nécessité du récepteur ER α dans ce processus. De plus, il semble que l'internalisation du récepteur MOR induite par l'estradiol soit due à une signalisation non génomique médiée par le récepteur ER α . Ce même chercheur a aussi étudié le rôle du récepteur ER α sur les ganglions spinaux (« Dorsal Root Ganglion », DRG) de petits diamètres (les nocicepteurs). Il a démontré

que les récepteurs estrogéniques, plus spécifiquement ER α , modulent l'influx nociceptif transmis par ces nocicepteurs [Chaban et al., 2003].



[Chaban & Micevych, 2005]

Figure 10. Influence de l'estrogène sur l'influx calcique engendré par l'ATP dans des neurones de souris ER α KO et ER β KO

Chez les souris ER β KO, l'influx calcique est diminué lors de l'administration d'estradiol (E $_2$)(A). Chez les souris ER α KO, l'influx calcique n'est pas diminué lors de l'administration d'estradiol (E $_2$)(B).

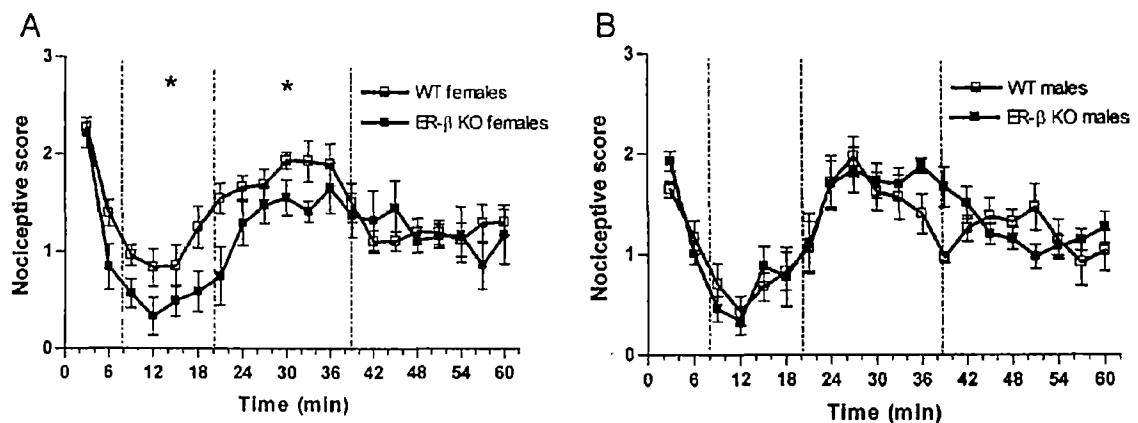
L'estradiol produit une diminution de l'influx calcique provoqué par les récepteurs P2X, par l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants de type L dans les DRG [Chaban et al., 2003]. Cette diminution est produite par un récepteur estrogénique de type membranaire et est réversible par un antagoniste pharmacologique des estrogènes. En conclusions, ces résultats permettent de penser que le récepteur ER α est essentiel à la modulation du flux calcique provoqué par l'ATP

3.4 Le récepteur ER β dans la douleur

Puisque le récepteur ER β est fréquemment associé à plusieurs fonctions cérébrales, il fut un des premiers à avoir été étudié dans la perspective de la douleur. En fait, plusieurs études comportementales ont démontré son rôle sur l'anxiété [Lund et al., 2005]. En effet, le récepteur ER β est exprimé dans le NRM [Lu et al., 2001, Alves et al., 1998b] et est souvent colocalisé avec des neurones sérotoninergiques [Gundlah et al., 2001, Bethea et al., 2002]. De plus, certaines études ont démontré le rôle du récepteur ER β dans la régulation des systèmes monoaminergiques [Mitra et al., 2003]. Ce sont par ces voies que les centres supérieurs contrôlent la transmission présente au niveau de la moelle épinière (voir section 1.3.1). Toujours au niveau des centres supérieurs, le récepteur ER β serait aussi exprimé dans certains interneurones inhibiteurs, particulièrement les interneurones GABAergiques [Blurton-Jones & Tuszynski, 2002].

Deux études ont observé de façon concrète le rôle du récepteur ER β sur la nociception. Premièrement, Leventhal et ses collaborateurs [Leventhal et al., 2006] ont administré du ERB-041, un agoniste sélectif du récepteur ER β , dans un modèle de rat avec douleur inflammatoire induite par la carragénine. Le but était d'étudier l'effet anti-hyperalgésique sur des modèles pré-cliniques. Ils ont démontré qu'une seule dose d'ERB-041 atténue l'hyperalgésie thermique. Cette étude ne visait cependant pas à comprendre les mécanismes neurophysiologiques de la douleur puisque l'ERB-041 ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) et que ce composé possède une activité anti-inflammatoire démontrée, agissant donc sur l'origine du stimulus douloureux plutôt que sur les processus centraux impliqués dans la douleur.

Deuxièmement, Spooner et ses collaborateurs [Spooner et al., 2007] ont étudié le rôle du récepteur $ER\beta$ sur la réponse nociceptive au test à la formaline. Ils ont utilisé un modèle de souris $ER\beta$ KO avec remplacement hormonal continu (estradiol et progestérone). Ces résultats lui ont permis de démontrer que le récepteur $ER\beta$ joue un rôle dans l'inhibition de la douleur. En effet, les réponses nociceptives des souris $ER\beta$ KO étaient inférieures à celles des souris $ER\beta$ WT durant l'interphase du test à la formaline, ainsi que durant la phase 2 précoce.



[Spooner et al., 2007]

Figure 11. Les résultats du test à la formaline chez les souris mâles et femelles $ER\beta$ KO

A. Une diminution du comportement nociceptif est observée chez les souris femelles $ER\beta$ KO particulièrement durant l'interphase et la phase 2a. B. Cette différence entre les femelles $ER\beta$ KO et de type sauvage (WT) n'est pas observée chez les souris mâles.

3.5 L'étude des récepteurs estrogéniques dans la douleur

3.5.1 L'utilisation de ligands

L'utilisation de ligand pharmacologique est un élément très important en physiologie expérimentale. Il s'agit d'une molécule se liant à une enzyme ou un récepteur particulier provoquant ou non une modification structurale de la protéine. Cette liaison peut entraîner l'activité de la protéine, soit un agoniste, entraîner l'inactivité de façon réversible ou non de la protéine, soit un antagoniste, ou bien entraîner l'activité opposée de la protéine, soit un agoniste inverse. Un ligand peut être spécifique, c'est-à-dire qu'il interfère avec un seul médiateur endogène (ex. agoniste spécifique des récepteurs adrénergiques, il ne se lie pas aux récepteurs histaminergiques ni sérotoninergiques), et peut être sélectif, particulier à une sous-classe de récepteurs (ex. un agoniste se lie à un sous-récepteur α -adrénergique, mais pas au sous-récepteur β -adrénergique). En résumé, l'utilisation de ces molécules permet de cibler un récepteur particulier ou un sous-type de récepteur particulier sans avoir d'effet sur les autres populations de récepteurs. Il peut être utilisé en supplément, donc simultanément aux molécules endogènes, ou en remplacement, lorsque l'on enlève les molécules endogènes et qu'on les remplace par un ou plusieurs types de molécule pharmacologique.

L'utilisation d'agoniste ou d'antagoniste permet certains avantages que les souris transgénique (KO) n'offrent pas, particulièrement, il évite les différentes étapes de création, de reproduction et de génotypage des souris transgéniques. De plus, les souris KO ne sont pas disponibles pour toutes les protéines tandis que les ligands sont beaucoup plus courants. Leur utilisation permet

d'éviter la compensation à moyen et à long terme par d'autres gènes. Cependant, il est essentiel de tenir compte des paramètres d'absorption, de distribution et de métabolisation des composés.

En ce qui concerne les récepteurs estrogéniques, une large gamme d'agonistes et d'antagonistes possédant différentes spécificités et sélectivités sont disponibles, les plus utilisés sont l'estradiol (E2), le DPN et le PPT.

L'estradiol (E2)

L'estradiol est un agoniste non sélectif des récepteurs estrogéniques. Il se lie avec la même affinité aux récepteurs ER α et ER β . À dose suffisante il provoque l'hypertrophie de l'utérus.

Le diaryl propionitrile (DPN)

Il s'agit d'un ligand sélectif au sous-récepteur estrogénique bêta. L'affinité relative de ce ligand est 70 fois plus élevée envers le récepteur ER β qu'envers le récepteur ER α . Lund et al. (2005) ont démontré que chez le rat, à une dose de 1 mg/kg, le DPN ne se lie pas au sous-récepteur alpha.

Le Propylpyrazol trisphenol (PPT)

Il s'agit d'un agoniste sélectif pour le sous-récepteur ER α . Il possède une sélectivité 410 fois plus élevée envers le récepteur ER α qu'envers le récepteur ER β . Frasor et al. (2003) ont démontré que 4 mg/kg administrés chez la souris, est la plus petite dose provoquant l'hypertrophie de l'utérus.

On peut mesurer l'absorption et la biodisponibilité des ligands sélectifs pour le récepteur ER α par leur effet sur l'hypertrophie de l'endomètre utérin. De plus, on connaît assez bien l'effet de ces ligands sur l'augmentation des niveaux de corticostérone plasmatique (concentration augmentée lors de l'injection d'estradiol (E2) ou de PPT, diminuée lors de l'injection de DPN), ou sur l'expression des récepteurs de la progestérone (augmentation de PR dans le noyau préoptique médial, après quatre jours d'injections d'E2 ou de PPT, mais pas lors de l'injection du DPN) [Lund et al., 2005].

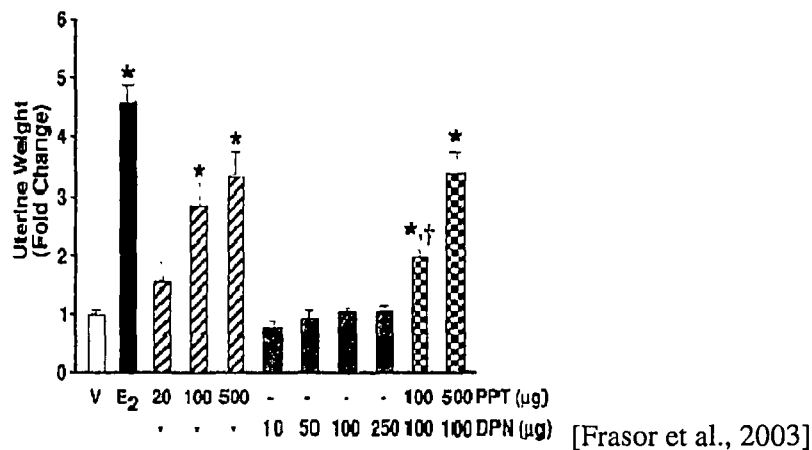


Figure 12. Effet des différents agonistes sur l'hypertrophie de l'utérus

L'estradiol (E2) et le PPT provoquent une hypertrophie de l'utérus, mais pas le DPN [Frasor et al., 2003].

3.5.2 L'utilisation de souris transgéniques

L'utilisation d'un modèle de souris transgénique permet d'observer la déplétion d'un gène particulier et ainsi d'observer l'impact d'une perte de fonction d'une certaine protéine.

Brièvement, cette manipulation consiste à introduire dans un blastocyte de souris, à l'aide d'une cellule souche, une mutation, empêchant l'expression d'un gène spécifique [Zimmer, 1992]. Le développement de cette cellule embryonnaire produit une souris mutante dont une des protéines (dans ce cas-ci un des récepteurs estrogéniques) n'est pas exprimée ou est exprimée incorrectement, ce qui l'empêche d'être fonctionnelle. Cependant, les phénotypes des souris mutantes sont aussi dépendant des cellules souches embryonnaires (généralement de souche 129), [Simpson et al., 1997] et des blastomères (aussi appelés blastocytes, généralement provenant d'une souris C57BL/6) utilisés dans la création du mutant.

L'utilisation de souris transgéniques apporte une puissance supplémentaire aux études pharmacologiques. Elle permet d'éviter les failles expérimentales associées aux ligands, telles que la dose, l'absorption et la biodisponibilité au site d'action. Aucune limite liée à la sélectivité des ligands n'a à être considérée. Cependant, lorsque l'on mute un gène, on peut s'attendre à ce qu'il y ait compensation par un ou plusieurs autres gènes [Beaulieu, 2005, IASP, 2004].

De plus, il est important de considérer le bagage génétique des souris transgéniques qui peut altérer certaines fonctions. Mogil et ses collaborateurs ont déterminé que la souche C57BL/6, une des plus utilisées dans la conception de souris transgéniques, est une des souches génétiquement distinctes les plus sensibles à la douleur, mais une des plus résistantes à l'analgésie, ce qui nous empêche de généraliser à l'espèce murine entière [Mogil et al., 1999, Lariviere et al., 2001].

Objectifs

CHAPITRE 4 : OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE L'ÉTUDE

4.1 Hypothèses de recherche

L'estrogène affecte plusieurs régions et plusieurs neurotransmetteurs associés à la transmission et à la modulation de la douleur. Cependant, il existe deux récepteurs nucléaires traduisant les effets physiologiques de l'estrogène. Ces deux récepteurs sont distincts tant au niveau de leur distribution dans le CNS, ainsi que dans leur rôle physiologique. Donc, l'hypothèse de cette recherche est que ces deux récepteurs pourraient avoir des implications différentes dans les mécanismes neurophysiologiques associés à la transmission et à la modulation de la douleur.

4.2 Objectifs

4.1.1 Objectif général

L'objectif général de ce projet de recherche est de caractériser le rôle qu'ont les récepteurs estrogéniques sur la réponse nociceptive.

4.2.2 Objectifs spécifiques

Objectif 1 : Confirmer, chez la souris C57BL/6, les résultats obtenus par Gaumond et al., 2002

Objectif 2 : Étudier l'effet pharmacologique d'un agoniste spécifique du récepteur $ER\beta$ sur la réponse nociceptive aiguë, tonique, et du contrôle inhibiteur de la douleur chez la souris.

Objectif 3 : Étudier l'effet pharmacologique d'un agoniste spécifique du récepteur $ER\alpha$ sur la réponse nociceptive aiguë, tonique, et du contrôle inhibiteur de la douleur chez la souris.

Objectif 4 : Caractériser la réponse nociceptive aiguë, tonique et du contrôle inhibiteur de la douleur chez la souris $ER\alpha KO$.

4.3 Résultats attendus

4.3.1 Implication du récepteur $ER\alpha$

En considérant nos connaissances du récepteur $ER\alpha$, il est possible d'émettre l'hypothèse que ce récepteur modulera la propagation de l'influx nerveux ainsi que la libération de neurotransmetteurs impliqués dans la douleur au niveau synaptique, notamment l'ATP [Chaban & Micevych, 2005]. Puisque l'on sait que la phase 1 du test à la formaline représente directement l'activation des fibres C par les nocicepteurs, on peut donc s'attendre à une modification du comportement nociceptif durant cette phase.

De plus, on pourrait croire que le récepteur $ER\alpha$ modulera la libération de peptides opioïdes associée à l'internalisation des récepteurs MOR [Micevych et al., 2003]. Le système

opioïdergique est davantage associé à l'inhibition de la douleur. Durant le test à la formaline, les effets de cette inhibition pourraient être observés au niveau de l'interphase.

4.3.2 Implication du récepteur ER β

L'observation d'une diminution de comportement douloureux chez les souris ER β KO permet de penser que l'injection d'un ligand spécifique aura l'effet opposé, donc augmentera le comportement douloureux durant l'interphase et la phase 2a.

Matériels et méthodes

CHAPITRE 5 : LE PROTOCOLE

5.1 Les animaux utilisés

Les animaux utilisés sont des souris de type C57BL/6 autant pour les souris de type sauvages (WT) que transgéniques (KO, B6.129P2-Esr1^{tm1Ksk}/J, Jax Mice). Certaines souris ont été achetées directement chez Charles River (St-Constant, Québec), mais pour la plupart elles ont été reproduites à l'animalerie de la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé (FMSS) de l'Université de Sherbrooke. Les souris ont été hébergées dans des cages contenant de 1 à 4 souris par cage. La nourriture et l'eau leur ont été fournies à volonté. Leur pièce était contrôlée pour l'éclairage (12h/12h), la température et l'humidité. Les chirurgies et expérimentations ont été faites dans une pièce séparée. Les expérimentations ont été faites à des heures constantes soit entre 8h et 12h, afin d'éviter l'influence du rythme circadien. Toutes les souris étaient acclimatées aux manipulations et à l'équipement expérimental.

5.1.1 Objectif 1 : Confirmer les résultats de Gaumond et al., 2002 et Gaumond et al., 2005

Puisque l'expérimentation chez les modèles transgéniques nécessite l'utilisation de souris C57BL/6 plutôt que de rats, il est primordial de confirmer les expérimentations qui ont été faites chez le rat puisqu'il est impossible d'extrapoler les résultats du rat chez la souris, particulièrement avec les souris de souche C57BL/6. Le but principal de cet objectif est de

déterminer si les hormones sexuelles mâles et femelles modulent la réponse nociceptive associée au test à la formaline. Cinq groupes de souris ont été utilisés soit des femelles avec leurs ovaires intacts (F_SHAM), des mâles avec leurs testicules intacts (M_SHAM), des femelles et des mâles gonadectomisés (respectivement OVX et CAST), ainsi qu'un groupe de femelles ovariectomisées avec un supplément en estrogène sous forme d'injection quotidienne pendant sept jours.

Tableau 1 : Les différents groupes de souris (objectif 1)

| Indicatif | Sexe | Gonadectomie | Remplacement/Ligand | n |
|-----------|------|--------------|---------------------------|----|
| OVX | F | OVX | Véhicule | 10 |
| F_SHAM | F | SHAM_OVX | Véhicule | 13 |
| CAST | M | CAST | Véhicule | 10 |
| M_SHAM | M | SHAM_CAST | Véhicule | 10 |
| OVX+E2 | F | OVX | Estradiol (E2), 100 µg/kg | 9 |

5.1.2 Objectif 2 : Ligand du récepteur ER β

Le but de cet objectif est d'observer l'effet de l'activation du récepteur estrogénique β sur la modulation de la douleur. Pour répondre à cet objectif, des souris femelles ovariectomisées ont reçu un agoniste sélectif à ER β , le DPN, et ont été comparées à des souris femelles ovariectomisées contrôles (véhicule seulement).

Tableau 2 : Les différents groupes de souris associés à l'étude des effets pharmacologique d'un agoniste spécifique des récepteurs ER β (objectif 2)

| Indicatif | Sexe | Gonadectomie | Remplacement/Ligand | n |
|-----------|------|--------------|---------------------|----|
| OVX | F | OVX | Véhicule | 10 |
| OVX+DPN | F | OVX | Ligand DPN, 1 mg/kg | 8 |

5.1.3 Objectif 3 : Ligand du récepteur ER α

L'objectif est d'observer l'effet de l'activation du récepteur estrogénique α sur la modulation de la douleur. Pour répondre à cet objectif, des souris femelles ovariectomisées ont reçu un agoniste sélectif au récepteur ER α , le PPT, et ont été comparées à des souris femelles ovariectomisées contrôles (véhicule seulement).

Tableau 3 : Les différents groupes de souris associés à l'étude des effets pharmacologiques d'un agoniste spécifique et sélectif des récepteurs ER α (objectif 3)

| Indicatif | Sexe | Gonadectomie | Remplacement/Ligand | n |
|-----------|------|--------------|---------------------|----|
| OVX | F | OVX | Véhicule | 10 |
| OVX+PPT4 | F | OVX | Ligand PPT, 4 mg/kg | 14 |

5.1.4 Objectif 4 : Souris ER α KO

L'objectif est d'observer l'effet de la délétion du récepteur estrogénique α sur la modulation de la douleur. Pour répondre à cet objectif, des souris ER α KO (KO, B6.129P2-Esr1^{tm1Ksk}/J, Jax Mice) ont été utilisées. Brièvement, des souris hétérozygotes pour l'allèle muté d'ER α ont été

accouplées et les souriceaux ont été génotypés selon le protocole décrit au point 5.2 ci-bas. Des souris mâles ER α KO ont été comparées à des mâles ER α WT, et des souris femelles ER α KO ont été comparées à des femelles ER α WT. Puisque les souris ER α KO présentent une dysfonction ovarienne, les souris ER α KO et les souris ER α WT ont été ovariectomisées et ont reçu un remplacement hormonal sous-cutané à libération constante afin qu'elles aient toutes un niveau hormonal comparable tel que décrit à la section 5.4.1. Puisque les femelles subissent une intervention chirurgicale (ovariectomie et insertion d'un implant) et pas les mâles, il est impossible de les comparer entre eux en regard des différences inter-genre.

Tableau 4 : Les différents groupes de souris associés à la caractérisation de la réponse nociceptive chez les souris ER α KO (objectif 4)

| Indicatif | Sexe | Génotype | Gonadectomie | Remplacement/ Ligand | n |
|-----------|------|--|--------------|-------------------------|----|
| F_WT | F | Sauvage (WT) | OVX | implant | 8 |
| F_KO | F | le gène Esr1; Esr1 ^{tmIKsk} est invalidé (KO) | OVX | implant | 9 |
| M_WT | M | Sauvage (WT) | N/A | N/A | 12 |
| M_KO | M | le gène Esr1; Esr1 ^{tmIKsk} est invalidé (KO) | N/A | N/A | 14 |

5.2 Génotypage

Le génotypage des souris ER α KO est fait par technique de PCR (« polymerase chain reaction ») sur l'ADN génomique extrait d'une section de queue de l'animal. Un fragment d'environ 4-5 mm est coupé de la queue de l'animal lors du sevrage, c'est-à-dire 21 jours après la naissance.

La digestion a été faite à 55°C durant la nuit avec de la protéinase K (5 µL) dans 300 µL de tampon NID (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL pH 8.3, 2 mM MgCL2, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20). L'échantillon est ensuite incubé dans l'eau bouillante pendant 10 minutes. On utilise ensuite ces extraits contenant de l'ADN génomique pour le génotypage de l'animal. Chaque réaction de PCR a un volume final de 50 µL et comprend 5 µL de tampon d'amplification Thermo Pol (New England Biolabs, Ipswich, MA), 1 µL du mélange d'amorces, 1 µL de dNTPs 10 mM (GE Healthcare, Buckinghamshire, England), 1 µL de TAQ-pfu DNA polymérase (Stratagene), 3 µL de l'extrait d'ADN génomique et 39 µL d'eau stérile. Les amorces d'oligonucléotides proviennent de chez IDT et sont décrites dans le Tableau 5. Le protocole de PCR est décrit dans le Tableau 6.

Tableau 5 : Les oligonucléotides utilisés pour les protocoles de génotypage

| | | |
|----------|---|---|
| oIMR0013 | 5'- CTT ggg Tgg AgA ggC TAT TC -3' | Amorce reconnaissant la cassette du gène de résistance PGK-neomycin servant à la mutation |
| oIMR0014 | 5'- Agg TgA gAT gAC Agg AgA TC -3' | Amorce reconnaissant la cassette du gène de résistance PGK-neomycin servant à la mutation |
| oIMR3100 | 5'- Cgg TCT ACg gCC AgT Cgg gCA CC -3' | Amplification d'un fragment de l'allèle sauvage |
| oIMR3101 | 5'- gTA gAA ggC ggg Agg gCC ggT gTC -3' | Amplification d'un fragment de l'allèle sauvage |

Tableau 6 : Étapes du protocole de PCR associé au génotypage des souris ER α KO

| Étape | T°C | Temp | |
|-------|-------|--------|---------|
| 1 | 95 °C | 5 min | |
| 2 | 94 °C | 1 min | 35 fois |
| 3 | 60 °C | 2 min | |
| 4 | 72 °C | 3 min | |
| 5 | 72 °C | 10 min | |
| 6 | 4 °C | | |

Suite à l'amplification, les produits de PCR sont migrés sur gel d'agarose 1% (Laboratoire MAT, Beauport, QC, Canada) et le génotype est déterminé selon la longueur des fragments, soit 239 pb pour les animaux ER α WT et 280 pb pour les souris ER α KO.

5.3 Les chirurgies

Les gonadectomies, les insertions d'implant d'estradiol et de progestérone (objectif 4) ont été effectuées sous anesthésie à l'isoflurane (induction 3%, maintient 1,5%). Toutes les chirurgies sont effectuées sur un coussin chauffant afin d'éviter l'hypothermie durant la chirurgie.

5.3.1 Ovariectomie

Après avoir anesthésié l'animal, les flans sont rasés et désinfectés (soit avec de la chlorhexidine ou de l'éthanol 70 %). Une incision de la peau et de la paroi abdominale d'environ 0,5-1 cm est faite. Les ovaires droits et gauches sont mobilisés à l'aide d'une pince, et libérés du tissu de support à l'aide d'un ciseau à dissection. L'extrémité de la corne utérine est clampée et l'ovaire

ainsi que l'extrémité de la trompe sont sectionnés et retirés de la cavité abdominale. Après l'excision des ovaires, les plans du péritoine et les plans de la peau sont suturés (suture de vycril 5-0 absorbable et suture de soie 5-0 non-absorbable).

Pour les animaux témoins (Sham, simulés), l'incision des flancs et du péritoine est pratiquée. Les ovaires et les cornes utérines sont localisés, mais ne sont pas extériorisés.

5.3.2 Castration

Après avoir anesthésié l'animal, la peau et le sac scrotal sont incisés sur une longueur d'environ 0,5 à 1 cm. Une seule incision est nécessaire pour atteindre les deux testicules. Le muscle crémaster est ouvert par une petite incision de 7 mm. L'enveloppe testiculaire est localisée et extériorisée. Le cordon testiculaire, contenant le canal déférent et les vaisseaux sanguins, est clampé et ligaturé sous le testicule et l'épididyme (suture de vycril 5-0 absorbable). Le testicule est ensuite excisé à l'aide d'un ciseau à dissection. La procédure est répétée pour le deuxième testicule. Les structures restantes sont replacées à l'intérieur de la cavité scrotale. Par la suite, la peau est suturée (suture de soie 5-0 non-absorbable).

Pour les animaux témoins (Sham, simulés), seulement l'incision du scrotum est pratiquée. La tunique et les testicules ne sont pas touchés.

5.4 Les remplacements hormonaux

5.4.1 Implants (objectif 4)

Un implant est inséré sous la peau interscapulaire durant la même période d'anesthésie que l'ovariectomie. Une incision d'environ 1 cm est faite à la hauteur des omoplates (à la base du cou). L'implant contient 0,5 mg de 17- β -estradiol et 10 mg de progestérone à libération contrôlée sur 90 jours (Innovative Research of America). Ceci permet aux souris des différents groupes d'avoir des niveaux circulants d'hormones similaires et relativement physiologiques, malgré la dysfonction ovarienne présente chez les souris ER α KO.

5.4.2 Ligands injectés (objectif 2 et 3)

Les ligands sont injectés en solution dans de l'huile de maïs, de façon sous-cutanée durant sept jours consécutifs. Le matin de l'expérimentation, le ligand est injecté une heure avant le début du test afin de permettre l'absorption et la distribution du ligand dans l'organisme.

Tableau 7: Ligands utilisés pour les différents groupes de souris

| Ligand | Dose | Solvant |
|----------|-----------|---------------------------|
| Véhicule | 0 mg/kg | Éthanol |
| DPN | 1 mg/kg | Éthanol |
| PPT | 4 mg/kg | Éthanol |
| PPT | 4 mg/kg | Diméthyl-O-Sulfate (DMSO) |
| E 2 | 0,1 mg/kg | Éthanol |

5.5 Test à la formaline

À l'aide d'une seringue à tuberculine, une injection sous-cutanée de 20 μ L d'une solution de formaldéhyde 2% est faite dans la plante de la patte arrière droite de l'animal [Tjolsen et al., 1992]. L'injection de formaldéhyde 2% provoque une réponse nociceptive maximale et comporte une composante inflammatoire [Henry et al., 1999]. De plus, cette injection produit une réponse douloureuse de type tonique. Aussitôt l'injection effectuée, l'animal est déposé dans une cage en plexiglas entourée de miroir afin d'observer son comportement nociceptif. Cette observation est d'une durée de 60 minutes et les comportements ont été notés en continu tels que décrits par Dubuisson et Denis (1977).

0 = La patte injectée demeure complètement au sol

1 = La patte injectée a peu ou pas de poids placé sur elle

2 = La patte injectée est soulevée

3 = La patte injectée est léchée ou mordillée

Suite à cette période, l'animal sera euthanasié et l'utérus des femelles est prélevé et conservé.

5.6 Analyse des données

L'analyse du test à la formaline a été effectuée selon trois méthodes. Premièrement, une moyenne des scores obtenus est calculée par bloc de 3 minutes et les résultats sont divisés en fonction des quatre phases du test. Le temps en seconde (s) passé en comportement de « trépidement », soulèvement de la patte dans le but d'éviter la douleur, est mesuré par bloc de

62

trois minutes et les résultats sont divisés en fonction des quatre phases du test à la formaline. Le temps (s) passé en comportement de « lèchement » (ici ont aussi été considéré comme lèchement le comportement de mordillement), lorsque la souris lèche la patte injectée, est mesuré par bloc de trois minutes et les résultats sont divisés en fonction des quatre phases du test à la formaline.

Puisque le nombre de sujet par groupe est inférieur à 30 et que les données ne sont pas distribuées normalement (Test Shapiro-Wilk), des tests statistiques non-paramétriques sont utilisés. Un niveau de signification de $\alpha = 0,05$ a été utilisé.

Les scores nociceptifs des souris intactes et gonadectomisées (objectif 1) sont analysés en fonction de leur statut hormonal par une ANOVA non-paramétrique de type Kruskal-Wallis. En plus, un test post-hoc non-paramétrique de type Mann-Whitney a été effectué afin de comparer entre les différents groupes le score nociceptif moyen de chacune des phases.

Les scores nociceptifs des souris ayant reçu des agonistes pour les récepteurs estrogéniques ($ER\alpha$ et $ER\beta$) (objectif 2 et 3) sont analysées en fonction de leur traitement par une ANOVA non-paramétrique de type Kruskal-Wallis. En plus, un test post-hoc non-paramétrique de type Mann-Whitney a été effectué afin de comparer entre les différents groupes le score nociceptif moyen de chacune des phases.

Afin de comparer le score nociceptif moyen entre chacune des phases pour chacun des groupes de souris, les souris transgéniques (ER α KO et ER α WT) ont été comparées (objectif 4) en fonction de leur sexe et de leur génotype par un test T non-paramétrique de type Mann-Whitney.

Le poids des utérus a été analysé par une ANOVA non-paramétrique de type Kruskal-Wallis. Un test post-hoc non-paramétrique de type Mann-Whitney a été effectué afin de comparer les poids entre chacun des groupes de souris.

Résultats

CHAPITRE 6 : RÉSULTATS

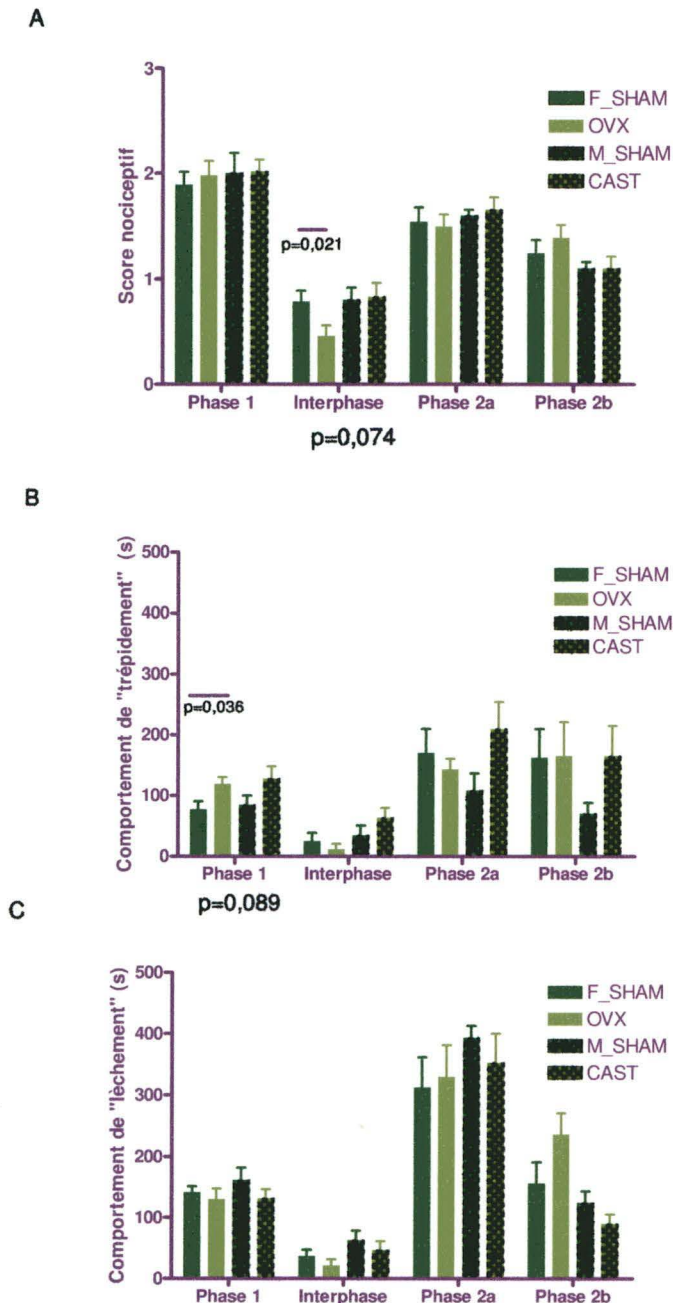
6.1 Caractéristique du comportement douloureux entre les sexes des souris C57BL/6j (objectif 1)

6.1.1 Comparaison des comportements nociceptifs associés au test à la formaline entre les mâles et les femelles C57BL/6j

L'analyse des comportements douloureux des souris C57BL/6j mâles et femelles saines et gonadectomisées a pour but de caractériser, dans un premier temps, leurs réactions comportementales au test à la formaline. Cette comparaison des souris présentant différents statuts hormonaux a été faite à l'aide d'un test non paramétrique de type Kruskal-Wallis (KW) et de tests posthoc non paramétriques de Mann-Whitney (MW). Ces analyses ont permis de démontrer qu'il n'y a pas de différence significative entre les réponses nociceptives des souris mâles et femelles, gonadectomisées ou intactes, et ce, pour toutes les phases du test à la formaline (Fig. 13). Par contre, durant l'interphase, il existe une tendance statistiquement non-significative (même si le test de Mann-Whitney est significatif, puisque le test de Kruskal-Wallis non-significatif nous ne pouvons pas conclure à une différence significative, KW, $p=0,074$; MW, $p=0,021$) qui est observée au niveau du score comportemental nociceptif qui semblent être plus élevés durant l'interphase chez les femelles intactes que chez les femelles ovariectomisées (Fig. 13A). Une tendance pronociceptive est aussi observée chez les femelles

intactes lors de la phase 1 du comportement de « trépidement » (encore une fois, même si le test de Mann-Whitney est significatif, puisque le test de Kruskal-Wallis est non-significatif nous ne pouvons pas conclure à une différence significative, KW, $p=0,089$; MW, $p=0,036$) (Fig. 13B).

Figure 13. Influence de la présence et de l'absence d'hormones sexuelles sur le comportement nociceptif lors des différentes phases du test à la formaline chez des souris C57BL/6



Ces graphiques montrent l'influence de la présence ou de l'absence d'hormones sexuelles (OVX n=10, F_SHAM n=13, CAST n=10, M_SHAM n=10) dans la réponse nociceptive engendrée par le test à la formaline. A. Représentation du score comportemental nociceptif moyen durant chacune des phases du test à la formaline. B. Représentation du temps passé en comportement de « trépignement » lors des différentes phases du test à la formaline. C. Représentation du temps passé en comportement de « lèchement » lors des différentes phases du test à la formaline. Les symboles (* et #) représentent les résultats statistiquement significatifs. Les « * » représentent les statistiques du test Man-Whitney, tandis que les « # » représentent les résultats statistiques du test Kruskal-Wallis. Les valeurs de P qui ne sont pas accompagnées de symboles ne sont pas statistiquement significatives, mais sont considérées comme des tendances. Les données représentent des Moyennes \pm Erreurs types.

6.1.2 Influence des hormones sexuelles femelles sur les comportements nociceptifs associés au test à la formaline

Afin de comprendre l'effet de l'ovariectomie et du remplacement hormonal sur les comportements nociceptifs des souris femelles, nous avons comparé la réponse au test à la formaline des groupes OVX, OVX+E2 et INT. Le score comportemental nociceptif, le comportement de «trépidement» et le comportement de «lèchement» ont été observés de façon distincte afin d'éviter les artéfacts possibles associés au test à la formaline, comme discuté dans la section 1.4.2 de l'introduction. L'analyse des variances non paramétriques par le test le Kruskal-Wallis (KW) a révélé que l'état hormonal des femelles affectait le comportement nociceptif global durant l'interphase ($p=0,017$) et la phase 2b ($p=0,016$) (Fig. 14A). Le comportement de «trépidement» varie aussi selon ces conditions, cependant dans ce cas-ci c'est la phase 1 ($p=0,001$) et l'interphase ($p=0,011$) qui sont modulées (Fig. 14B). Finalement, le comportement de «lèchement» a été modifié par les conditions hormonales des femelles durant la phase 2b ($p<0,001$) et de façon non significative durant l'interphase ($p=0,060$) et la phase 2a ($p=0,073$) (Fig. 14C). Les réponses nociceptives des groupes OVX+E2 et INT ont été comparées au groupe contrôle sans hormone (OVX) et analysées posthoc par un test de Mann-Whitney (MW).

OVX+E2 vs OVX

Cette comparaison vise à analyser l'influence d'un remplacement estrogénique chez des souris ovariectomisées. Tout d'abord, les souris OVX + E2 ont un comportement de «trépidement» plus élevé que les souris OVX durant la phase 1 ($p=0,006$) (Fig. 14B). Ensuite, la comparaison

des souris OVX+ E2 à celles OVX révèle un score nociceptif plus élevé lors de l'interphase ($p=0,010$) (Fig. 14A). Dans ce cas-ci, le score nociceptif des souris OVX+E2 serait davantage lié au comportement de « flinching » ($p=0,003$) (Fig. 14B) plutôt qu'au comportement de « lèchement » ($p=0,604$) (Fig. 14C). Par ailleurs, nous avons aussi observé que les souris OVX+E2 avaient une tendance à présenter un comportement de « lèchement » durant la phase 2a plus bas que les souris OVX (même si le test de Mann-Whitney est significatif, puisque le test de Kruskal-Wallis est non-significatif nous ne pouvons pas conclure à une différence significative, KW : $p=0,073$; MW : $p=0,043$) (Fig. 14C). Finalement, chez les souris OVX+E2, on observe un score comportemental significativement moins élevé durant la phase 2b ($p=0,002$) (Fig. 14A). Durant cette phase, le score nociceptif plus faible associé au remplacement estrogénique serait due au comportement de « lèchement » ($p<0,001$) (Fig. 14C).

F_SHAM vs OVX

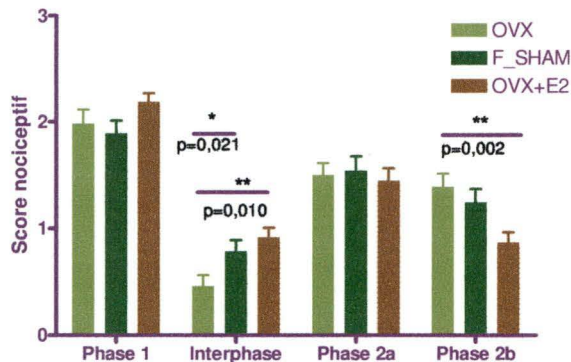
La comparaison des souris dont l'ovariectomie a été simulée (dont les ovaires sont intacts) (F_SHAM) et les souris réellement ovariectomisées (OVX) vise à analyser l'influence d'une déprivation hormonale par ovariectomie sur les réponses nociceptives au test à la formaline. Lors de la phase 1 du comportement de « trépidement » (Fig. 14B), les souris F_SHAM présentent des réponses nociceptives inférieures aux souris OVX. Cette variation n'est pas représentée lors de l'analyse du comportement de « lèchement » ou le score nociceptif. Il est important de considérer que le niveau de signification (α) devrait être divisé par deux (selon la théorie de Bonferroni) puisque le test a été fait à deux reprises (OVX vs F_SHAM et OVX vs OVX+E2).

Donc, si l'on voulait être strictement rigoureux nous devrions considérer ce résultat comme une excellente tendance plutôt qu'un résultat statistiquement significatif.

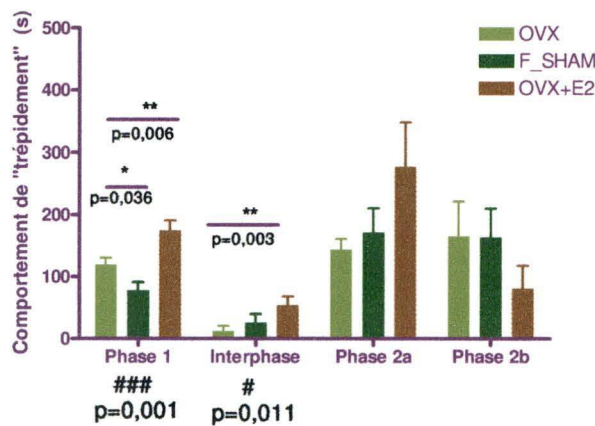
Les résultats démontrent que les souris OVX présentent un comportement nociceptif inférieur aux souris F_SHAM durant l'interphase ($p=0,021$) (Fig. 14A). Ce comportement ne semble pas être associé au comportement de « lèchement » ou au comportement de « trépidement ».

Figure 14. Influence des hormones sexuelles chez les femelles sur les réponses nociceptives associées au test à la formaline

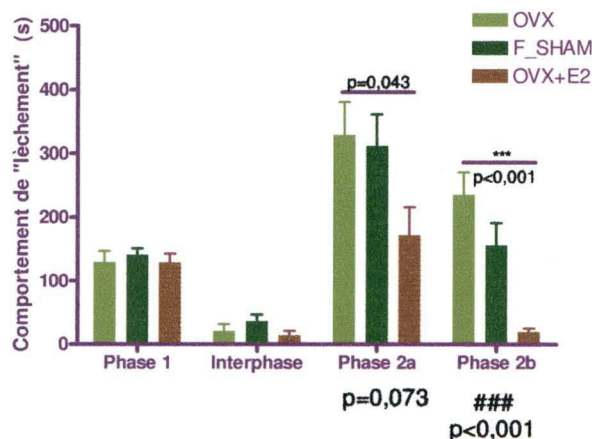
A



B



C



Comparaison des réponses douloureuses associées au test à la formaline chez des souris C57BL/6j présentant différentes combinaisons d'hormones sexuelles (OVX n=10, OVX+E2 n=9, et F_SHAM n=13). A. Représentation du score comportemental nociceptif moyen durant chacune des phases du test à la formaline. B. Représentation du temps passé en comportement de « trépidement » lors des différentes phases du test à la formaline. C. Représentation du temps passé en comportement de « lèchement » lors des différentes phases du test à la formaline. Les symboles (* et #) représentent les résultats statistiquement significatifs. Les « * » représentent les statistiques du test Man-Whitney, tandis que les « # » représentent les résultats statistiques du test Kruskal-Wallis. Les valeurs de P qui ne sont pas accompagnées de symboles ne sont pas statistiquement significatives, mais sont considérées comme des tendances. Les données représentent des Moyennes \pm Erreurs types.

6.2 Influence de l'injection d'agonistes sélectifs des récepteurs estrogéniques α et β sur les réponses nociceptives au test à la formaline

Un des objectifs particuliers de cette étude était de caractériser l'influence d'un agoniste spécifique aux différents récepteurs nucléaires de l'estrogène sur le comportement douloureux de la souris C57BL/6j. Les comportements nociceptifs de souris injectées avec différents agonistes, soit le PPT, un agoniste sélectif au récepteur $ER\alpha$, et le DPN, un agoniste sélectif au récepteur $ER\beta$, ont été comparés aux comportements de souris contrôles sans hormone sexuelle (OVX). Différents comportements nociceptifs ont été évalués, dont le score comportemental, le comportement de « trépidement » et le comportement de « lèchement ». Tel qu'illustré à la figure 15A, l'analyse des variances non paramétriques par le test le Kruskal-Wallis (KW) a permis de montrer que l'injection d'agonistes pour les récepteurs estrogéniques module significativement le score comportemental durant les quatre phases du test à la formaline. Par ailleurs, le comportement de « trépidement » varie aussi selon les agonistes injectés (Fig. 15B), lors de l'interphase et des phase 2a et 2b. De plus, tel qu'illustré à la figure 15C, l'analyse du comportement de « lèchement » démontre que l'injection d'agoniste ($ER\alpha$ ou β) affecte aussi les quatre phases du test à la formaline.

De façon plus spécifique, chaque agoniste provoque une variation distincte des comportements nociceptifs. Cette variation a été démontrée par une comparaison des groupes avec agoniste (soit PPT ou DPN) au groupe contrôle sans hormone (OVX) par un test de Mann-Whitney.

OVX+DPN vs OVX

Chez les souris injectées avec le DPN, un agoniste du récepteur ER β , en comparaison avec les souris OVX, nous avons noté un score nociceptif plus élevé durant l'interphase ($p=0,013$) et la phase 2a ($p=0,013$), alors qu'un score nociceptif moindre a été observé durant la phase 2b ($p=0,013$) (Fig. 15A). Ces variations de comportement au niveau de l'interphase seraient autant liées au comportement de « trépidement » ($p=0,028$) (Fig. 15B) qu'au comportement de « lèchement » ($p=0,003$) (Fig. 15C). Par contre, les variations du score comportemental durant la phase 2a (Fig. 15A) seraient majoritairement attribuables au comportement de « trépidement » chez ces souris (FL : $p=0,006$, LK : $p=0,133$) (Fig. 15B). Le moindre score comportemental nociceptif des souris recevant du DPN durant la phase 2b (Fig. 15A), serait dû autant au comportement de « lèchement » ($p<0,001$) (Fig. 15C) qu'à celui de « trépidement » ($p=0,001$) (Fig. 15B).

OVX+PPT vs OVX

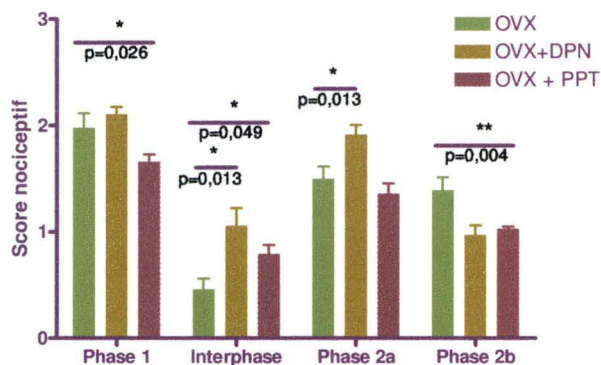
Les souris injectées avec le PPT, en comparaison avec les souris OVX, ont un score comportemental associé au test à la formaline plus élevé durant l'interphase ($p=0,049$) et plus bas durant la phase 2b ($p=0,004$) (Fig. 15A). L'hyperalgésie, donc le comportement nociceptif plus élevé que le comportement nociceptif des souris contrôles, qui a été mesurée par le score comportemental durant l'interphase ne semble être due ni au comportement de « trépidement » ($p=0,376$) (Fig. 15B) ni au comportement de « lèchement » (Fig. 15C). En effet, le comportement de « lèchement » des souris injectées au PPT est même significativement plus bas que celui des souris contrôles ($p=0,003$) (Fig. 15C). La moindre algésie des souris OVX+PPT

durant la phase 2b, comme évalué par le score comportemental, semblerait dans ce cas-ci, autant liée au comportement de « lèchement » ($p < 0,001$) (Fig. 15C) qu'au comportement de « trépidement » ($p < 0,001$) (Fig. 15B). Par ailleurs, on observe chez les souris injectées au PPT un comportement de « lèchement » significativement plus bas durant la phase 1 ($p = 0,015$) (Fig. 15C), en comparaison avec les souris OVX.

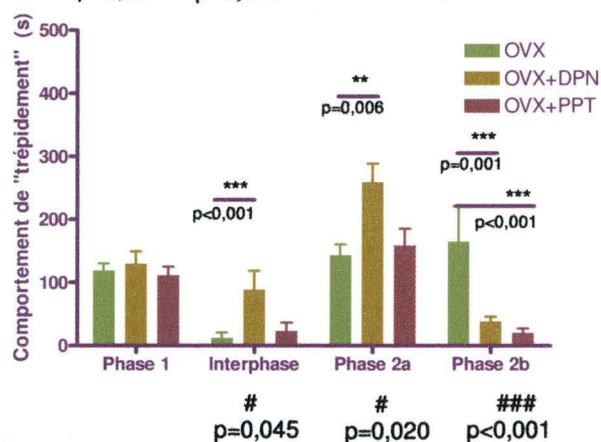
Il est important de noter, lors de la comparaison du score nociceptif des souris OVX vs OVX+PPT durant l'interphase (Fig. 15A), que le test de Kruskal-Wallis est statistiquement significatif, et que le test de Mann-Whitney l'est également. Cependant, il est important de considérer que le niveau de signification (α) devrait être divisé par deux (selon la théorie de Bonferroni) puisque le test a été fait à deux reprises (OVX vs OVX+DPN et OVX vs OVX+PPT). Donc, si l'on voulait être strictement rigoureux nous devrions considérer ce résultat comme une excellente tendance plutôt qu'un résultat statistiquement significatif.

Figure 15. Comportements nociceptifs associés au test à la formaline des souris injectées avec un ligand spécifique à ER α ou ER β

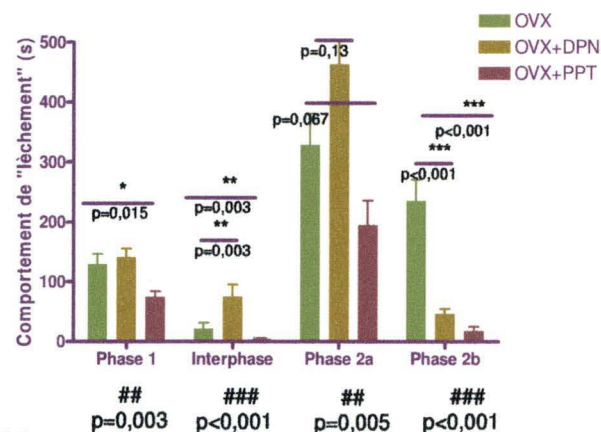
A



B



C



Comparaison des réponses nociceptives associées au test à la formaline de souris C57BL/6j OVX (n=10) injectées avec un agoniste sélectif à ER α (PPT, n=14) ou à ER β (DPN, n=8) et de souris contrôles OVX injectées avec le véhicule. A. Représentation du score comportemental nociceptif moyen durant chacune des phases du test à la formaline. B. Représentation du temps passé en comportement de « trépidement » lors des différentes phases du test à la formaline. C. Représentation du temps passé en comportement de « lèchement » lors des différentes phases du test à la formaline. Les symboles (* et #) représentent les résultats statistiquement significatifs. Les « * » représentent les statistiques du test Man-Whitney, tandis que les « # » représentent les résultats statistiques du test Kruskal-Wallis. Les valeurs de P qui ne sont pas accompagnées de symboles ne sont pas statistiquement significatives (dans ce cas-ci, puisque la valeur de P est plus élevée que le seuil de signification posé à 0,05), mais sont considérées comme des tendances. Les données représentent des Moyennes \pm Erreurs types.

6.3 Influence de la délétion du gène codant pour le récepteur ER α sur le comportement nociceptif associé au test à la formaline

Un des objectifs était de caractériser le comportement nociceptif associé au test à la formaline chez des souris ER α KO. Les comportements nociceptifs de souris femelles ER α KO ont été comparés à ceux de souris femelles ER α WT, alors que les comportements nociceptifs des souris mâles ER α KO ont été comparés à ceux des souris mâles ER α WT. Les femelles n'ont pas été comparées aux mâles puisque toutes les souris femelles ont été ovariectomisées et supplémentées avec une capsule d'estrogène et de progestérone à libération constante, tandis que les mâles n'ont pas subi de chirurgie, ce qui pourrait influencer les mesures de réponses nociceptives de ces groupes. Les différents comportements nociceptifs ont été évalués, dont le score nociceptif comportemental, le comportement de « trépidement » et le comportement de « lèchement ». Les groupes de souris ER α KO et ER α WT ont été comparés par un test de Mann-Whitney (MW).

6.3.1 Modification des comportements nociceptifs associés au test à la formaline chez les femelles ER α KO (Objectif 4)

Nos résultats ont démontré un score nociceptif plus élevé chez les souris ER α KO femelles en comparaison aux souris femelles ER α WT, lors de la phase 1 ($p=0,036$) et de l'interphase ($p=0,006$) (Fig. 16A). L'hyperalgésie présente au niveau de la phase 1 serait davantage (bien

que non significative) due au comportement de « lèchement » ($p=0,059$) (Fig. 16C), tandis que celle présente lors de l'interphase serait davantage reliée au comportement de « trépidement » ($p=0,046$) (Fig. 16 B).

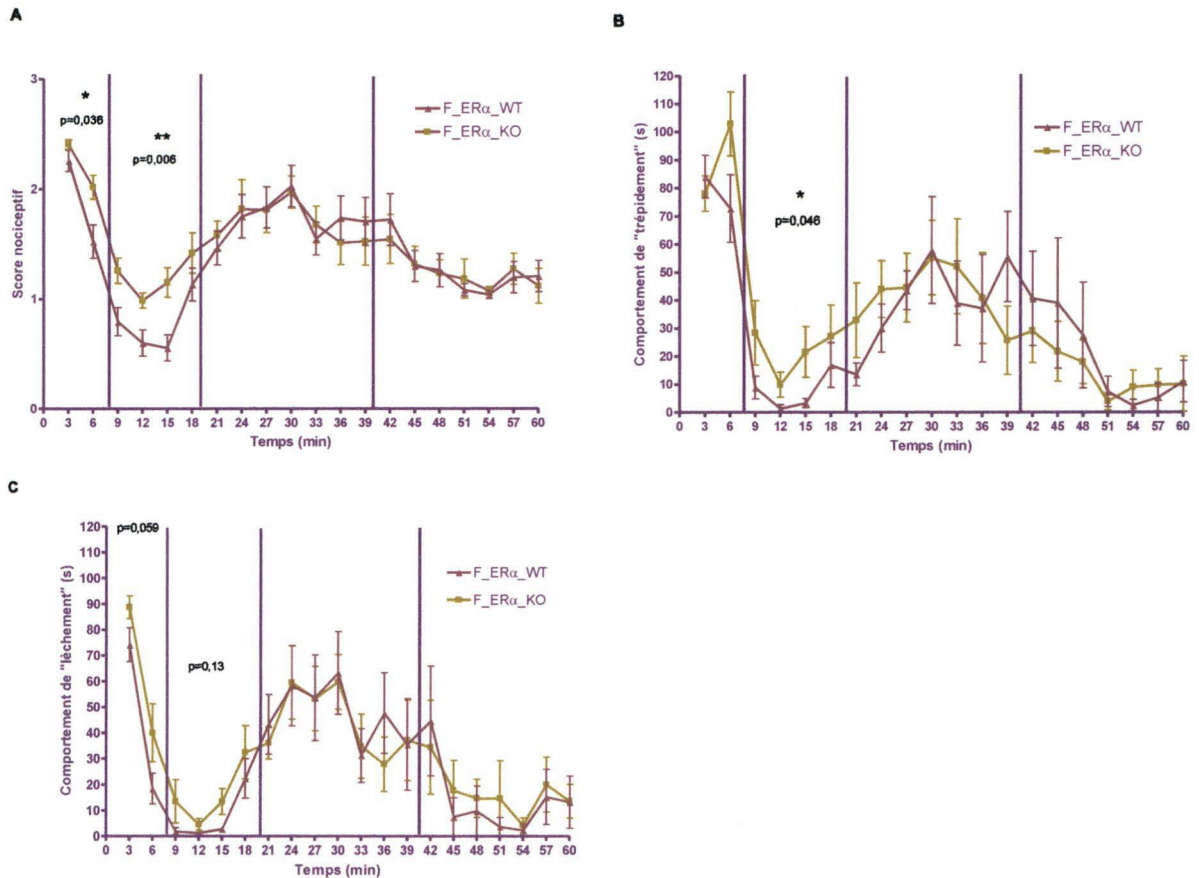


Figure 16. Comportements nociceptifs associés au test à la formaline des femelles ERαKO et

ERα WT

Comparaison des réponses nociceptives associées au test à la formaline chez des souris ERαKO (n=9) et ERαWT (n=8) femelles. A. Représentation du score comportemental nociceptif moyen durant chacune des phases du test à la formaline. B. Représentation du temps passé en comportement de «trepidement» lors des différentes phases du test à la formaline. C. Représentation du temps passé en comportement de «lèchement» lors des différentes phases du test à la formaline. Les «*» représentent les statistiques significatives du test Man-Whitney. Les valeurs de P qui ne sont pas accompagnées de symboles ne sont pas statistiquement significatives (dans ce cas-ci, puisque la valeur de P est plus élevée que le seuil de signification posé à 0,05), mais sont considérées comme des tendances. Les données représentent des Moyennes ± Erreurs types.

6.3.2 Modification des comportements nociceptifs associés au test à la formaline chez des souris mâles ER α KO

Chez le mâle, les résultats obtenus démontrent que les souris ER α KO ont un score comportemental de douleur plus important que les souris de type sauvage (ER α WT) spécifiquement durant la phase 1 du test à la formaline ($p=0,002$) (Fig. 17A). Cette hyperalgésie des souris ER α KO serait autant influencée par le comportement de « lèchement » ($p=0,009$) (Fig. 17C) que par le comportement de « trépidement » ($p=0,003$) (Fig. 17B).

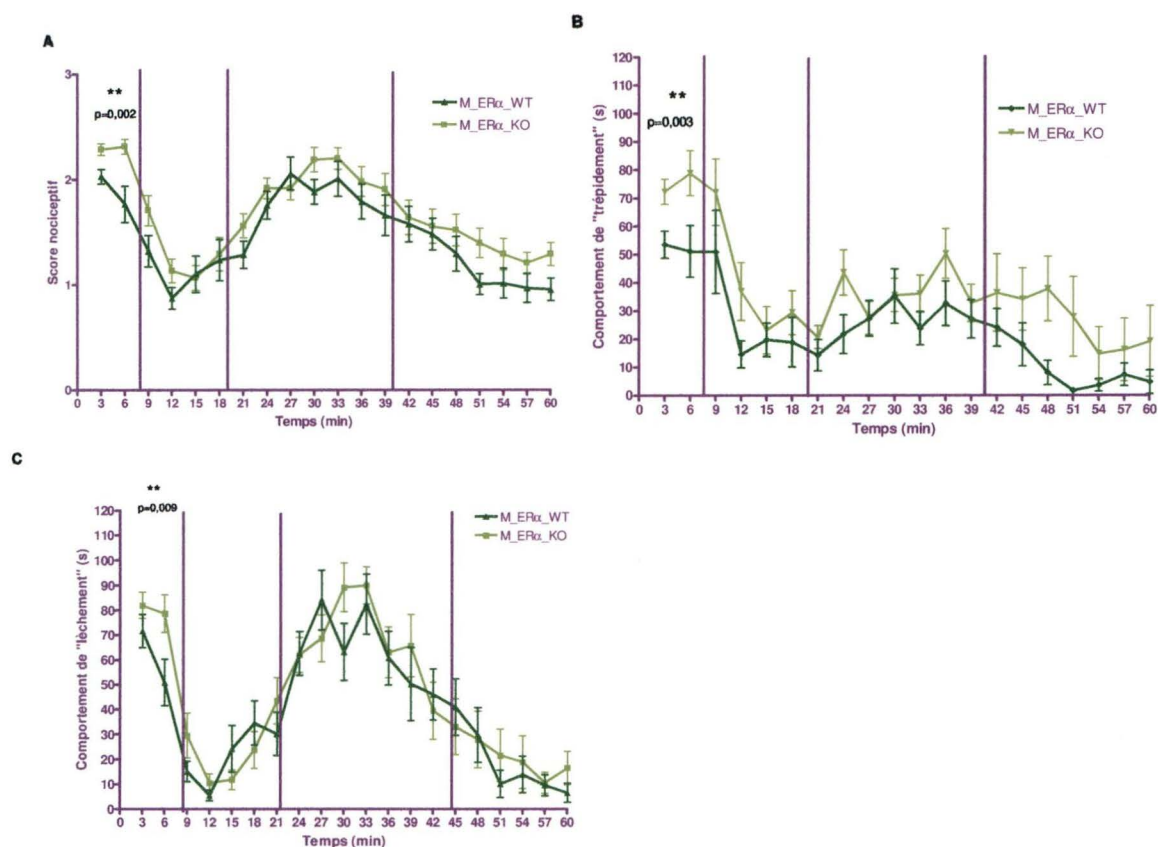


Figure 17. Comportements nociceptifs associés au test à la formaline des mâles ERα KO et ERα WT

Comparaison des réponses nociceptives associées au test à la formaline des souris ERαKO (n=14) et ERαWT (n=12) mâles. A. Représentation du score comportemental nociceptif moyen durant chacune des phases du test à la formaline. B. Représentation du temps passé en comportement de « trépidement » lors des différentes phases du test à la formaline. C. Représentation du temps passé en comportement de « lèchement » lors des différentes phases du test à la formaline. Les « * » représentent les statistiques significatives du test Man-Whitney. Les données représentent des Moyennes \pm Erreurs types.

6.4 Validation interne : Hypertrophie de l'utérus des différents groupes de souris femelles

Afin de valider la biodisponibilité et la spécificité des agonistes utilisés, les utérus des souris femelles ont été prélevés post-mortem et pesés. Il est connu que la liaison de l'estrogène aux récepteurs estrogéniques α provoque l'hypertrophie de l'utérus, alors que l'activation du récepteur estrogénique β n'a pas d'action trophique sur l'endomètre utérin. On suppose donc que si les composés sont bien absorbés et distribués le poids de l'utérus sera modifié en conséquence des composés injectés (véhicule, E2, PPT). Théoriquement, les femelles intactes (F_SHAM), les femelles injectées avec de l'estradiol (OVX+E2) et les femelles injectées avec le PPT devraient montrer une hypertrophie significative de l'utérus en comparaison avec les souris contrôles (OVX) [Frasor et al., 2003, Couse & Korach, 1999a].

Tel qu'illustré à la figure 18, le test statistique de Mann-Whitney a permis de démontrer que les souris F_SHAM ($p=0,004$), OVX+E2 ($p<0,001$), et OVX+PPT ($p<0,001$) ont toutes un poids utérin significativement augmenté en comparaison des souris OVX, tandis que les souris OVX+DPN ont un poids utérin qui ne diffère pas de celui des souris OVX ($p=0,432$).

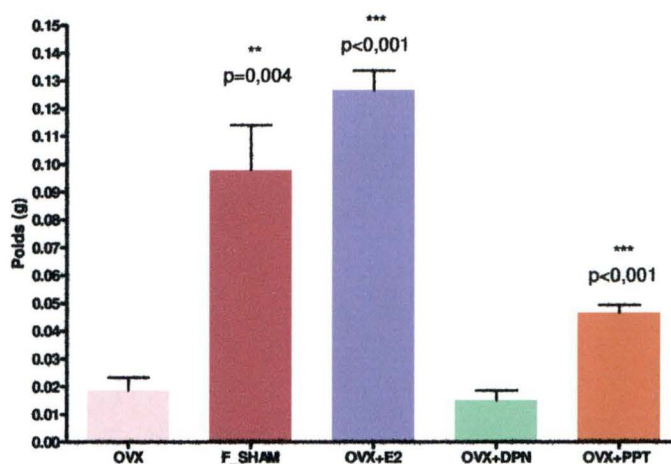


Figure 18. Poids des utérus des souris femelles en fonction de leur statut hormonal

Une augmentation du poids de l'utérus est observée chez les souris F_SHAM (n=13), OVX+E2 (n=9) et OVX+PPT (n=14) en comparaison des souris OVX (n=10). Aucune augmentation n'est observée chez les souris OVX+DPN (n=8) en comparaison des souris OVX. Test statistique de Mann-Whitney. Les données représentent des Moyennes \pm Erreurs types.

Puisque le sous-récepteur estrogénique α est responsable de l'hypertrophie de l'utérus, le poids de ceux-ci a aussi été mesuré dans le groupe de souris ER α KO afin de confirmer les résultats du génotypage. Selon la littérature, l'utérus des souris ER α KO devrait peser la moitié moins que celui des souris sauvages [Lubahn et al., 1993, Couse & Korach, 1999b, Couse & Korach, 1999a].

Tel qu'illustré à la figure 19, les souris femelles ER α KO (F_ER α _KO) présentent des utérus de poids plus faible que ceux des femelles avec ER α (F_ER α _WT) ($p=0,009$).

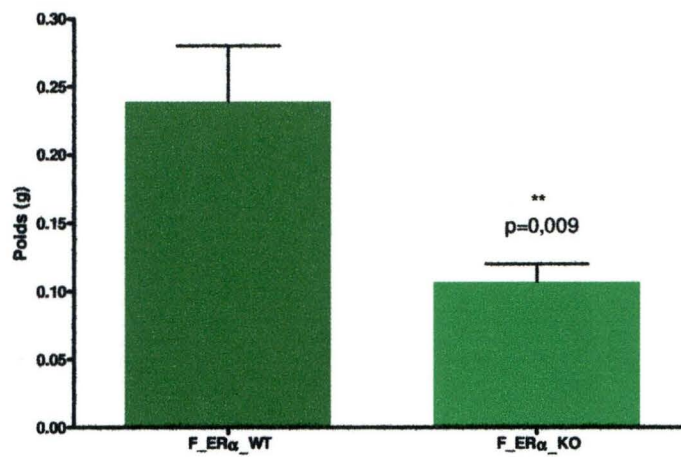


Figure 19. Poids de l'utérus des souris femelles en fonction de la présence ou non du récepteur $ER\alpha$

Les femelles $ER\alpha KO$ (n=9) présentent des utérus hypoplasiques. Leur poids est significativement plus faible que celui des souris $ER\alpha WT$ (n=8). Test statistique de Man-Whitney. Les données représentent des Moyennes \pm Erreurs types.

Discussion

CHAPITRE 7 : DISCUSSION DES RÉSULTATS

7.1 Caractéristique inter-sexe des souris C57BL/6j et rôle des hormones sexuelles dans la douleur

7.1.1 Différence mâle/femelle

L'analyse des comportements nociceptifs associés au test à la formaline n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les souris C57BL/6j mâles et femelles. Ce résultat était inattendu puisque plusieurs études chez le rat et la souris ont rapporté une différence entre les sexes dans les comportements nociceptifs. Il est très possible que nos résultats s'expliquent par la souche de souris utilisée. En effet, Leo et al. (2008) ont démontré que les comportements nociceptifs associés au test à la formaline varient entre les différentes souches de souris, et qu'il n'y avait pas de différence inter-sexe significative lors du test à la formaline chez les souris de souche C57BL/6j.

Il est important de rappeler qu'il est aussi possible de diviser les comportements, soit en « trépidement », et en « lèchement/mordillement », afin de tirer différentes conclusions. Ces comportements peuvent être associés à différents mécanismes neurophysiologiques, dont des mécanismes davantage spinaux (comportement de « trépidement » décrit davantage comme du « piétinement » puisque distinct du comportement de « retrait ») ou des mécanismes davantage

supraspinaux (comportement de « lèchement ») [Ceccarelli et al., 2003]. Le comportement de « trépidement » est souvent le plus utilisé puisqu'il est beaucoup moins modulé par les composantes environnementales [Tjolsen et al., 1991a, Tjolsen et al., 1991b, Berge et al., 1991, Wheeler-Aceto & Cowan, 1991]. Cette hypothèse sera discutée en relation avec les résultats obtenus.

7.1.2 Implication des hormones sexuelles femelles dans la douleur

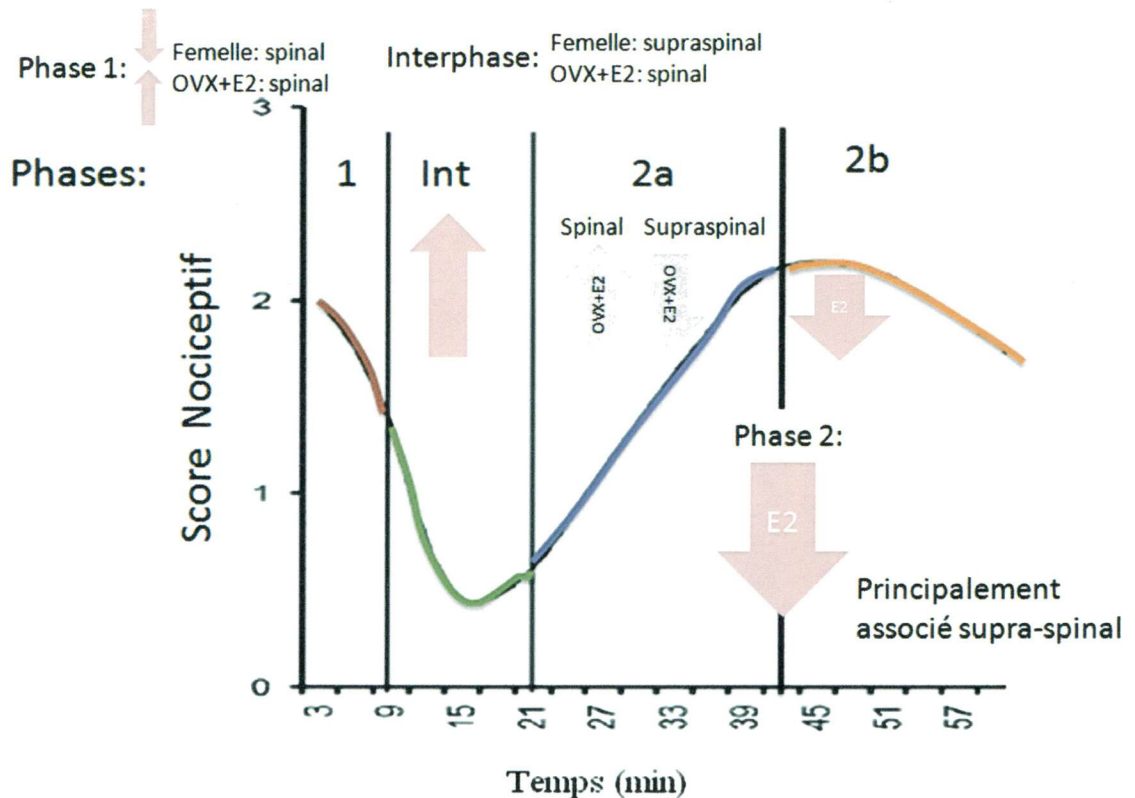


Figure 19. Graphique résumé de l'implication des hormones sexuelles femelles dans la modulation de la douleur

Graphique résumé des résultats au test à la formaline des souris femelles (F_SHAM) et des souris femelles ovariectomisées avec injection d'estradiol (OVX+E2) en comparaison des souris contrôlées (souris ovariectomisées, OVX). Les flèches roses représentent les résultats statistiquement significatifs, les flèches grises représentent les résultats statistiquement non-significatifs. La direction des flèches représente l'augmentation (↑) ou la diminution (↓) de la réponse nociceptive par rapport aux souris contrôles (OVX).

Bien que nous n'ayons pas observé de différence notable entre les mâles et les femelles lors du test à la formaline, le retrait des hormones sexuelles femelles suite à l'ovariectomie a provoqué

une modification du comportement nociceptif (F_SHAM vs OVX). En effet, les femelles intactes (possédant leurs ovaires) présentent une réponse nociceptive inférieure aux femelles ovariectomisées lors de la phase 1 du test à la formaline associé à un comportement spinal (puisque visualisé uniquement lors de l'analyse du comportement de « trépidement »), alors que pendant l'interphase les femelles ovariectomisées (OVX) présentent moins de comportements nociceptifs (autant au niveau du comportement de « trépidement » qu'au niveau du comportement de « lèchemenbt ») que celles ayant leurs ovaires intacts (F_SHAM). Nos résultats sont relativement comparables à ce que Gaumond et al. (2002) ont publié dans une étude impliquant le rat comme sujet expérimental.

Estradiol

Dû au très faible nombre de publications utilisant une supplémentation en estrogène chez la souris, la comparaison des résultats ne peut être faite qu'avec des résultats obtenus chez le rat. Comme discuté plus tôt, ces comparaisons doivent être faites avec prudence puisqu'il existe une différence entre les espèces qui est de plus en plus acceptée et évoquée dans la littérature scientifique. L'effet de l'estradiol (E2) sur la modulation de la douleur a été discuté par différents groupes de recherche et les résultats en ressortant ne sont pas toujours en accord. Il est d'ailleurs à considérer que la concentration d'estradiol est un facteur de variabilité entre les études [Nag & Mokha, 2006, Mannino et al., 2007, Smith et al., 2006, Craft, 2007], ainsi que le test utilisé [Sanoja & Cervero, 2008, Gaumond et al., 2005, Gordon & Soliman, 1996, Kuba et al., 2005, Dawson-Basoa & Gintzler, 1993] et l'heure de l'administration de l'estradiol [Gordon & Soliman, 1994].

Aucune autre équipe n'avait observé de modulation de la douleur lors du test à la formaline chez des animaux injectés avec de l'estradiol [Gaumond et al., 2005]. Plusieurs paramètres pourraient expliquer cette différence de résultats. Premièrement, dans la présente étude, l'estradiol a été injecté sur une base quotidienne durant sept jours. La plupart des autres études utilisaient des implants ou d'autres mécanismes à libération continue sous-cutanée [Gaumond et al., 2005, Kuba et al., 2005, Kuba et al., 2006, Mannino et al., 2007]. De plus, la durée du traitement peut avoir plusieurs répercussions sur les comportements observés, autant en ce qui concerne les effets de l'ovariectomie que ceux de l'injection d'agoniste. Il a été démontré que le temps passé en absence d'hormone a un impact considérable sur les comportements nociceptifs, particulièrement les comportements de « lèchement » [Ceccarelli et al., 2003]. Cependant, les paramètres qui semblent avoir eu le plus grand impact sont la durée du traitement et la dose d'estradiol administrée. En effet, il existe aussi un effet considérable du temps de traitement à l'estradiol, particulièrement sur la compensation par d'autres récepteurs ou sur la mise en œuvre d'un rétro-contrôle fait par l'estradiol sur son propre récepteur. Dans le même ordre d'idée, les concentrations plasmatiques et les doses d'estradiol varient d'une étude à l'autre, ce qui peut faire varier les résultats finaux et rendre plus ardue leur comparaison. Par exemple, il a été démontré que la quantité d'estradiol administrée module l'efficacité de l'antinociception associé au système opioïde endogène [Nag & Mokha, 2006, Mannino et al., 2007, Smith et al., 2006, Craft, 2007]. Puisqu'il a été démontré que l'interphase possède une composante opioïdergique [Gaumond et al., 2007], il est possible que ce soient ces facteurs (durée de traitement et dose) qui ont joué dans la divergence entre nos résultats et ceux d'autres équipes de recherche.

Phase 1

Les résultats du comportement de « trépidement » obtenus lors de la phase 1 du test à la formaline ne coïncident pas très bien avec les résultats de Gaumond et al. (2002).

Dans un premier temps, si l'on voulait être strictement rigoureux nous devrions considérer ce résultat comme une excellente tendance plutôt qu'un résultat statistiquement significatif. En effet, le niveau de signification (α) devrait être divisé par deux (selon la théorie de Bonferroni, $\alpha=0,025$) puisque le test a été fait à deux reprises (OVX vs F_SHAM et OVX vs OVX+E2). En considérant ce niveau de signification, la variation observée lors de la phase 1 du test à la formaline n'est plus significatif.

Dans un second temps, sur ce même graphique de comportement de « trépidement », il est possible d'observer que les souris OVX+E2 ont une réponse nociceptive plus élevée que les femelles OVX, et donc une variation d'autant plus grande entre les souris F_SHAM et OVX+E2. Ces résultats suggèrent une implication légèrement antinociceptive de la progestérone dans ces variations de réponse nociceptive de type spinale. Une hypothèse supportant ce résultat serait la transformation de la progestérone en des métabolites 3α - 5α réduits, particulièrement en allopregnanolone (3α - 5α tetrahydroprogestérone) [Baulieu, 1998]. La formation de ce type de métabolite a été démontrée dans les cellules neuronales, les cellules gliales et les astrocytes, particulièrement au niveau de la moelle épinière [Mellon et al., 2001]. Cette molécule possède une affinité particulière pour les récepteurs GABA-A des interneurons inhibiteurs de la moelle

épineière [Belelli & Lambert, 2005]. Lorsque l'allopregnanolone se lie au récepteur GABA-A, son rôle de modulateur positif de ce récepteur produit une augmentation de la fréquence et de la durée d'ouverture de ce canal, ce qui augmente le potentiel inhibiteur de ces neurones [Lambert et al., 2003]. De plus, il a été démontré que la variation des niveaux d'hormone gonadique module la synthèse de ces métabolites 3α - 5α réduits [Frye & Duncan, 1996].

Interphase

Il est possible d'observer plusieurs similitudes dans les comportements nociceptifs entre les femelles possédant naturellement des hormones (E2+P) et celles injectées avec l'E2 suite au retrait des ovaires. Dans les deux cas, les souris présentent plus de comportements nociceptifs durant l'interphase que celles sans hormones sexuelles (OVX), suggérant un effet pro-nociceptif des hormones sexuelles femelles durant cette phase.

Les différences entre les souris F_SHAM et les souris OVX présentent durant l'interphase du test à la formaline ne sont significatives qu'au niveau du score comportemental. Comme mentionné plus tôt, le comportement de « lèchement » est considéré plus fiable chez la souris en comparaison du score comportemental décrit par Dubuisson and Dennis (1977). Chez ces souris, le fait que ni le comportement de « lèchement » ni le comportement de « trépidement » ne sont modifiés significativement, cela suggère que la majorité des variations du score comportemental seraient produites entre le stade 0 et le stade 1, deux stades très proches qui peuvent parfois être confondus dans certains cas. Comme mentionnée plus tôt, la discrimination entre des stades aussi proches, particulièrement chez la souris, un animal qui bouge beaucoup plus rapidement

que le rat, demande une expérience considérable dans l'attribution des scores pondérés pour les tests comportementaux [Tjolsen et al., 1992]. C'est pour cette raison que plusieurs auteurs utilisant la souris comme animal d'expérimentation lors du test à la formaline divisent les comportements nociceptifs (« lèchement », « retrait », « trépidement », « piétinement »), ou n'en quantifient qu'un seul, généralement le comportement de « lèchement » [Sugimoto et al., 1986, Abbott et al., 1981, Fanselow, 1984]. Donc, les variations entre les différents comportements pourraient s'expliquer par une forme d'artefact produite par la technique utilisée pour mesurer la réponse nociceptive, soit le score comportemental de Dubuisson and Dennis pour le rat, par rapport à la technique décrite par Murray (1988) pour la souris, mesurant uniquement le comportement de « lèchement ». Cependant, si cette technique de notation est véridique chez la souris, cette observation confirmerait très bien les observations faites par Gaumond et al., 2002 concernant le rôle des hormones gonadiques sur l'interphase du test à la formaline.

Lors de l'analyse plus détaillée des comportements nociceptifs, on peut noter que l'augmentation de la réponse nociceptive des souris OVX+E2 par rapport aux souris OVX durant l'interphase est due davantage au comportement de « trépidement » chez les souris supplémentées à l'estrogène. Ces résultats sont différents des observations faites par Gaumond et al. (2005). Lors de l'injection d'estradiol chez les rats, ils n'avaient observé aucune modification du score nociceptif lors de la phase 1 et de l'interphase du test à la formaline. Ces différences peuvent être attribuables à la modification du modèle animal utilisé ou à un manque de puissance. Il est possible, puisque les souris bougent plus rapidement, qu'une quantité de souris plus grande ait été nécessaire.

Phase 2

Comme publié par Gaumond et al. (2002), aucune différence n'a été observé entre les souris F_SHAM et les souris OVX lors de la phase 2 du test à la formaline. Cependant, les souris injectées avec l'estradiol ont présenté un score nociceptif et un comportement de « lèchement » plus faible que les souris OVX lors de la phase 2b. Cependant, il est possible d'observer une tendance soulignant cette diminution durant la phase 2a du comportement de « lèchement ». Gaumond et al. (2005) avaient observé une diminution significative pendant leur première partie de la phase 2 (21-60 min, qui représente toute la phase 2 mesurée dans l'expérimentation présente, tandis que la différence mesurée entre la 60^e et la 90^e minute était beaucoup moins importante).

Un effet anti-hyperalgésique de l'estrogène est généralement rapporté produisant la diminution des comportements douloureux lors du test à la formaline. Plus spécifiquement, plusieurs équipes ont observé une diminution du score comportemental durant la phase 2 du test à la formaline lors de l'injection d'estradiol suite à l'ovariectomie [Mannino et al., 2007, Kuba et al., 2006, Kuba et al., 2005]. Cet effet analgésique pourrait être attribuable à l'action anti-inflammatoire de l'estrogène puisque le comportement douloureux de la phase 2 est en partie associé à la réaction inflammatoire en réponse à l'injection de formaline. Lors de nos expérimentations, cette variation a été peu observée durant le comportement nociceptif global, cependant celle-ci était très évidente lors du comportement de « lèchement ».

Tel que mentionné plus haut, il a été maintes fois suggéré le rôle anti-inflammatoire de l'estrogène. Cependant, il est intéressant de remarquer l'augmentation du comportement de « trépidement » de la phase 2a des souris OVX+E2 alors que le comportement de « lèchement » tend à diminuer. Il est évident que la variation observée lors du comportement de « trépidement » n'est nullement significative et peut être due à de multiples facteurs de variation. Cependant, cette variabilité plus importante à ce niveau influence tout de même la mesure du score nociceptif de façon globale.

Finalement, contrairement à ces résultats, Aloisi and Ceccarelli (2000) ont démontré que lorsqu'injecté de façon intracérébroventriculaire l'estradiol produisait une augmentation des comportements de « lèchement » réversible par la naloxone, alors que ces comportements étaient absents lors de l'injection intrapéritonéale d'estradiol [Aloisi & Ceccarelli, 2000]. Ces résultats suggèrent un effet différent en périphérie et au niveau central. En effet, il est connu que les DRG des neurones périphériques possèdent des récepteurs estrogéniques ce qui permettrait de moduler la réponse inflammatoire à ce niveau [Taleghany et al., 1999]. Lors de notre expérimentation, l'estradiol était injecté de façon sous-cutanée, ce qui expliquerait que l'on n'observe pas d'augmentation du comportement de « lèchement » chez nos animaux.

En résumé, les résultats obtenus sont considérablement différents de ceux de Gaumond et al., (2002;2005). Les similarités sont présentes particulièrement durant l'interphase entre les souris F_SHAM et les souris OVX, où il y a augmentation de la réponse nociceptive en présence d'hormone sexuelle, et entre les souris OVX et OVX+E2 lors de la phase 2 du test à la

formaline, où la présence d'estradiol diminue la réponse nociceptive. Les différences sont observées particulièrement durant la première phase du comportement de « trépidement » à la fois lors de la comparaison souris F_SHAM vs OVX et OVX+E2 vs OVX. De plus, une autre différence s'est présentée lors de l'interphase du score comportemental entre les souris OVX+E2 vs OVX. Ces différences peuvent être attribuables à la modification du modèle animal utilisé ou à un manque de puissance. Il est possible, puisque les souris bougent plus rapidement, qu'une quantité de souris plus grande ait été nécessaire.

7.2 Rôle du récepteur ER β dans la modulation de la douleur

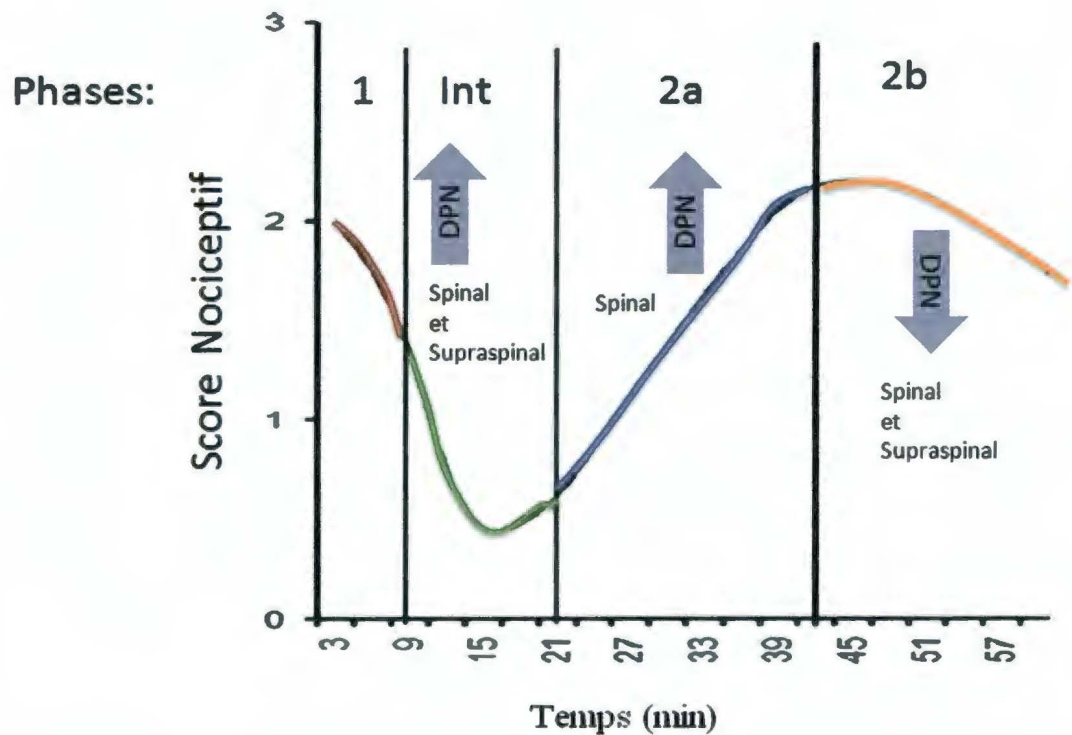


Figure 20. Graphique résumé de l'implication du récepteur ER β dans la modulation de la douleur

Graphique résumé des résultats au test à la formaline des souris femelles injectées avec l'agoniste spécifique du récepteur ER β (OVX+DPN) en comparaison des souris contrôles (souris ovariectomisées, OVX). Les flèches représentent les résultats statistiquement significatifs. La direction des flèches représente l'augmentation (↑) ou la diminution (↓) de la réponse nociceptive par rapport aux souris contrôles (OVX).

Un des objectifs était d'étudier l'effet pharmacologique d'agonistes spécifiques au récepteur ER β sur la réponse nociceptive aiguë, tonique, et du contrôle inhibiteur de la douleur chez la

souris. Puisque l'injection d'un agoniste spécifique au récepteur $ER\beta$ est en fait une suite du projet de Spooner et al. (2008), où la réponse nociceptive des souris $ER\beta KO$ a été étudiée, nous nous attendions à observer des réponses nociceptives miroirs au test à la formaline. Puisque les souris $ER\beta KO$ ont présenté une hypoalgésie en comparaison aux souris $ER\beta WT$, on pouvait donc s'attendre à une hyperalgésie chez les souris injectées avec le DPN durant l'interphase et la phase 2 précoce (phase 2a).

Phase 1

Tout comme observé chez les souris $ER\beta KO$, les souris injectées avec le DPN n'ont présenté aucune modification de la réponse nociceptive.

Interphase

La majoration de la douleur observée pendant l'interphase chez les souris OVX+DPN suggère fortement une influence négative du récepteur $ER\beta$ sur les voies inhibitrices descendantes. En effet, le récepteur $ER\beta$ est exprimé particulièrement au niveau du NRM et dans plusieurs neurones produisant et libérant la 5-HT [Nomura et al., 2003], un neurotransmetteur très influant pour les voies de contrôles inhibitrices de la douleur. Cette information suggère que le récepteur $ER\beta$ modulerait l'activité neurobiologique des voies inhibitrices descendantes, et donc, permettrait une diminution de la libération de neuromodulateurs monoaminergiques inhibiteurs au niveau de la moelle épinière. Une diminution de l'efficacité des systèmes descendants entraînerait donc une augmentation de la transmission des informations nociceptives, et donc une hyperalgésie, observée principalement au niveau de l'interphase du test à la formaline. De

plus, le récepteur ER β pourrait influencer la nociception via l'induction, dans les neurones du PVN et du SON, d'oxytocine et de vasopressine, deux modulateurs de plus en plus reconnus de la nociception [Hrabovszky et al., 1998, Alves et al., 1998a, Mitra et al., 2003].

L'amygdale est une région qui gère les réponses émotionnelles, particulièrement l'anxiété et la dépression [Walf & Frye, 2006]. En effet, plusieurs neurones sensibles aux hormones sexuelles y sont retrouvés, notamment des neurones sensibles à l'estrogène et à l'androgène [Simerly, 1990, Walf & Frye, 2006]. Il a été démontré que l'injection d'un agoniste spécifique au récepteur ER β (DPN) réduit considérablement les comportements anxiogènes chez le rat [Lund et al., 2005]. La présence de ce récepteur sur des neurones sérotoninergiques, comme mentionné ci-haut, ainsi que dans les régions facilitant la libération d'oxytocine, qui possède aussi un effet anxiolytique [Neumann, 2008, McCarthy et al., 1996], peuvent expliquer l'effet comportemental de l'agoniste DPN sur l'anxiété. De plus, il est fortement suggéré que cette région soit impliquée dans l'intégration de l'information nociceptive [Neugebauer, 2006], plus particulièrement sa composante émotionnelle [Sah et al., 2003]. Il est même suggéré que cette région soit impliquée dans les voies de modulation descendantes de la douleur [Heinricher et al., 2008]. En effet, par la présence de nombreux récepteurs opioïdes [Gackenhimer et al., 2005], gabaergiques [Neugebauer, 2006, Hasanein et al., 2008], oxytocinergiques [Neumann, 2008], ainsi que ces projections vers d'autres noyaux notamment la SGPA [Heinricher et al., 2008], lui confère une importance majeure dans la neurophysiologie de la douleur.

Les liens très étroits liant l'anxiété à la nociception rendent difficile la caractérisation du rôle précis des neurotransmetteurs impliqués dans chacune de ces situations. Entre autre, l'implication de la sérotonine et de la noradrénaline, deux neurotransmetteurs fortement impliqués dans les mécanismes neurophysiologiques de l'anxiété et de la dépression, ont largement été associés aux contrôles inhibiteurs descendants de la douleur [Millan, 2002]. Cependant, plusieurs évidences démontrent maintenant que la sérotonine ne serait pas exclusivement une composante inhibitrice, mais pourrait aussi être impliqué dans un mécanisme facilitateur de la douleur des voies descendantes [Suzuki et al., 2004]. La sérotonine se lie à plus de 15 types de récepteur produisant des effets soit pronociceptif soit antinociceptif. Particulièrement dans le tronc cérébral, où se situe le RVM, lors d'une activation tonique de la 5-HT les cellules excitatrices sont plus fortement stimulées ce qui engendre un effet facilitateur de la douleur [Urban and Gebhart, 1999, Morgan et al., 1994]. De plus, il a été démontré que l'injection de formaline active particulièrement les cellules excitatrices du NRM [Suzuki et al., 2002]. Puisque ces régions sont fortement influencées par les récepteurs estrogéniques, particulièrement le récepteur ER β , il est possible de suggérer que l'augmentation des réponses nociceptives chez ces souris soit associées à ces mécanismes.

Phase 2a

C'est cet effet miroir des souris ER β KO que nous avons observé, alors que les souris injectées avec le DPN ont présenté des scores nociceptifs plus élevés que les souris OVX. Ce comportement douloureux plus intense durant la phase 2a serait attribuable de façon plus importante au comportement de « trépidement », mais est tout de même représenté légèrement

par le comportement de « lèchement ». Le fait que l'interphase soit associée aux deux comportements nociceptifs, donc associée tant à un mécanisme spinal que supraspinal, tandis que la phase 2a est associée plus fortement au comportement de « trépidement », associée à un mécanisme spinal, permet de suggérer que la phase 2a ne serait pas produite par les mêmes mécanismes que l'interphase.

Phase 2b

En ce qui concerne les comportements nociceptifs de la phase 2 tardive (2b), les souris injectées avec le DPN ont présenté des comportements nociceptifs moindres, en comparaison avec les souris OVX. Il est à noter que ce phénomène est aussi observé lors de l'injection du PPT (voir section 7.3). En effet, le récepteur $ER\beta$ est connu et décrit pour son activité anti-inflammatoire. ERB-041, un agoniste du récepteur $ER\beta$, a démontré la capacité de réprimer certains gènes proinflammatoires [Cvoro et al., 2008]. Cet effet qui est au final anti-inflammatoire a aussi été observé *in vitro* et dans des modèles animaux de douleur inflammatoire [Gardell et al., 2008, Leventhal et al., 2006]. Ces observations pourraient expliquer les comportements nociceptifs moins élevés chez nos animaux lors de la phase tonique du test à la formaline. Par contre, ces variations nociceptives lors de la phase inflammatoire n'ont pas été observées chez les souris $ER\beta$ KO (voir résultats Spooner et al., 2008 présenté à la section 3.4). La différence majeure qui existe entre le modèle utilisant l'injection d'agoniste suite à l'ovariectomie et celui des souris transgénique ($ER\alpha$ KO ou $ER\beta$ KO), est l'ajout de progestérone via un implant chez les souris transgéniques. En effet, Kuba et ses collaborateurs [Kuba et al., 2006] ont démontré un effet significatif de l'administration de progestérone sur la capacité analgésique de l'estradiol lors de

la phase 2 du test à la formaline. Ils suggèrent même que la progestérone renverse l'effet anti-inflammatoire de l'estradiol durant cette phase. Cette action antagoniste de la progestérone sur l'estradiol pourrait expliquer la présence de variation des réponses nociceptives de la phase inflammatoire tardive (2b) entre le modèle d'injection d'agoniste et le modèle de souris transgéniques (ER α KO ou ER β KO).

En résumé, les résultats obtenus chez les souris OVX+DPN corrélaient très bien avec ceux des souris ER β KO. Dans tous les cas, les variations du score nociceptif sont représentées à la fois par les comportements de « trépidement » et de « lèchement ». Ces résultats permettent de suggérer des composantes à la fois spinales et supraspinales, ce qui est très pertinent considérant la présence des récepteurs ER β tant au niveau des centres supérieurs qu'au niveau de la moelle où les récepteurs y sont présents à tous les niveaux.

7.3 Rôle du récepteur ER α dans la modulation de la transmission et de l'inhibition de la douleur

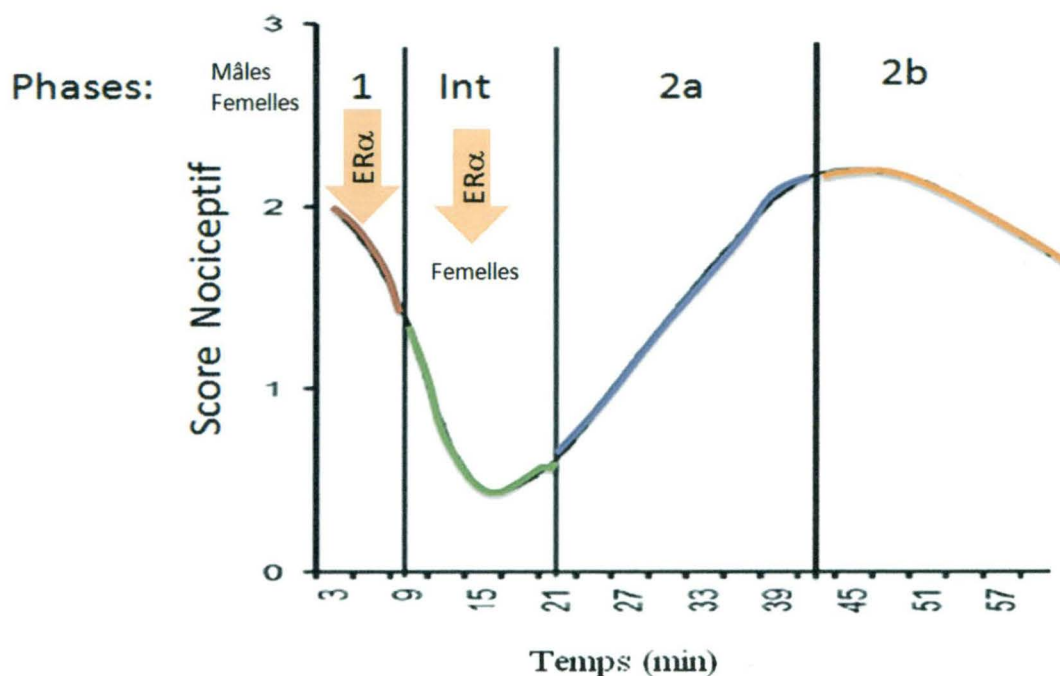


Figure 21. Graphique résumé de l'implication du récepteur ER α dans la modulation de la douleur

Graphique résumé des résultats au test à la formaline des souris femelles injectées avec l'agoniste spécifique du récepteur ER α (OVX+PPT) en comparaison des souris contrôles (souris ovariectomisées, OVX). Les flèches représentent les résultats statistiquement significatifs. La direction des flèches représente l'augmentation (\uparrow) ou la diminution (\downarrow) de la réponse nociceptive par rapport aux souris contrôles (OVX).

Un des objectifs particuliers de ma maîtrise était de caractériser l'implication du récepteur ER α dans la douleur aiguë, tonique ainsi que l'inhibition active de la douleur. Cette caractérisation chez l'animal de façon comportementale est primordiale puisque les seules expérimentations qui

ont été faites sur ce sous-récepteur avaient été effectuées *in vitro*. Il était donc pertinent de caractériser à la fois la douleur aiguë, tonique, ainsi que l'inhibition active de la douleur chez les souris ER α KO et lors de l'injection d'un ligand spécifique et sélectif à ce récepteur estrogénique. L'une comme l'autre, ces expérimentations sont aussi importantes. Puisque la souris ER α KO représente une perte de fonction du récepteur, tandis que l'injection de ligand est un gain de fonction de ce récepteur, on devrait théoriquement observer des effets miroirs l'un de l'autre.

Phase 1 : Modulation de la transmission de l'activité nociceptive par le récepteur ER α

Nous avons tout d'abord observé durant la phase 1 du test à la formaline un score nociceptif et un comportement de « lèchement » plus faibles chez les souris femelles injectées avec un ligand spécifique au récepteur ER α (OVX+PPT, gain de fonction), en comparaison aux souris ovariectomisées (OVX). Chez les souris ER α KO (perte de fonction), chez les femelles comme chez les mâles, un plus grand score comportemental est observé durant la phase 1 du test à la formaline. Ces résultats sont fortement dirigés par le comportement de « lèchement ».

Dans un premier temps, puisqu'il est connu que la phase 1 du test à la formaline représente l'activation des fibres C et est souvent associé au transport de l'information nociceptive entre la périphérie et la moelle, il est possible de suggérer que la diminution des comportements nociceptifs observée durant la phase 1 chez les souris possédant le récepteur ER α soit associée à une modulation de la transmission de l'activité nociceptive entre la périphérie et la moelle. Cette observation au niveau de la phase 1 du test à la formaline concorde très bien avec l'hypothèse de

départ qui était, selon Chaban et collaborateur (2005), que l'agoniste PPT, en se liant aux récepteurs $ER\alpha$ exprimés dans les DRG, diminue l'échange d'ions Ca^{2+} au niveau des fibres nociceptives présentes dans les DRG [Chaban & Micevych, 2005]. La diminution de ces ions induit une diminution de la propagation de l'influx nerveux. On sait que la phase 1 du test à la formaline représente directement l'activation des fibres C par les nocicepteurs, ce qui pourrait donc expliquer cette diminution du comportement nociceptif durant cette phase du test à la formaline. Dans le cas des souris $ER\alpha KO$, l'inactivité des récepteurs $ER\alpha$ a pu empêcher la diminution de l'échange d'ions Ca^{2+} au niveau des fibres nociceptives situées dans les DRG. On peut supposer que cette perte de fonction a empêché la diminution de la propagation de l'influx nerveux et la diminution de la libération de neurotransmetteurs au niveau synaptique. Cette théorie expliquerait que les souris $ER\alpha KO$ présentent une plus grande activité nociceptive, et donc plus de comportements douloureux associés à une augmentation de la transmission nociceptive que les souris $ER\alpha WT$. Finalement, les résultats obtenus sont constants dans les deux sexes et sont présents autant dans le modèle de gain que de perte de fonction du récepteur α . En résumé, ces résultats confirmeraient l'effet inhibiteur (hypoalgésique) de ce sous-récepteur sur la transmission nociceptive.

Cependant, puisque la réponse nociceptive du comportement de « lèchement » a été modifiée, représentant un mécanisme supraspinal, et non celle du comportement de « trépidement », représentant un mécanisme spinal, la transposition du résultat à une modification de l'activité nociceptive entre la périphérie et la moelle est difficile à expliquer. Une autre hypothèse serait l'action du récepteur $ER\alpha$ dans les régions associées à l'intégration du message nociceptif au

niveau des centres supérieurs, notamment le cortex. Il a d'ailleurs été démontré que les récepteurs $ER\alpha$ et $ER\beta$ sont présents dans cette région et leur expression est âge- et sexe-dépendant [Thakur & Sharma, 2007].

Interphase : Modulation du contrôle inhibiteur descendant par le récepteur $ER\alpha$

L'interphase est une période du test à la formaline où les comportements douloureux sont grandement diminués. Il s'agit d'une phase permettant l'observation des voies de contrôle endogène de la douleur.

L'hypothèse de départ concernant la modulation des contrôles endogènes de la douleur par le récepteur $ER\alpha$, donc la modulation de l'interphase du test à la formaline, a été émise considérant les résultats de Micevych [Micevych et al., 2003]. Celui-ci a démontré que le récepteur $ER\alpha$, par une voie non-génomique, est nécessaire à l'internalisation du récepteur MOR induite par l'estrogène. Puisque l'internalisation du récepteur MOR est due à une augmentation de la libération de peptides opioïdes, cela a permis de suggérer que l'activation du récepteur $ER\alpha$ produirait une augmentation de la libération de peptides opioïdes au niveau des centres supérieurs. Cet effet devait donc augmenter l'efficacité des systèmes d'inhibition de la douleur. Puisque ces effets sont particulièrement actifs lors de l'interphase du test à la formaline, on devrait donc observer une modulation des comportements douloureux durant cette phase.

Une observation superficielle de nos résultats démontrerait que le gain et la perte de fonction du récepteur $ER\alpha$ provoqueraient tout deux une augmentation du comportement douloureux

général durant l'interphase. Par exemple, lorsque l'on regarde de façon plus spécifique les résultats des tests nociceptifs des souris OVX+PPT, le comportement de « lèchement » est diminué de façon significative par rapport aux souris contrôles, et le comportement de « trépidement » n'est pas modifié. Premièrement, si l'on voulait être strictement rigoureux, nous devrions considérer ce résultat comme une excellente tendance plutôt qu'un résultat statistiquement significatif. En effet, le niveau de signification (α) devrait être divisé par deux (selon la théorie de Bonferroni, $\alpha=0,025$) puisque le test a été fait à deux reprises (OVX vs OVX+PPT et OVX vs OVX+DPN). En considérant ce niveau de signification, la variation observée lors de l'interphase du test à la formaline n'est plus significative. Deuxièmement, ces résultats suggèrent que toutes les variations du score comportemental seraient produites entre le stade 0 et le stade 1, deux stades très proches qui peuvent parfois être confondus dans certains cas. Comme mentionnée plus tôt, la discrimination entre des stades aussi proches, particulièrement chez la souris qui est un animal qui bouge beaucoup plus rapidement que le rat, demande une expérience considérable dans l'attribution des pointages pour les tests comportementaux [Tjolsen et al., 1992]. C'est pour cette raison que plusieurs auteurs utilisant la souris comme animal d'expérimentation lors du test à la formaline divisent les comportements nociceptifs (« lèchement », « retrait », « trépidement », « piétinement »), ou n'en quantifient qu'un seul, généralement le comportement de « lèchement » [Sugimoto et al., 1986, Abbott et al., 1981, Fanselow, 1984]. Donc, les variations entre les différents comportements pourraient s'expliquer par une forme d'artefact produite par la technique utilisée pour mesurer la réponse nociceptive, soit le score comportemental de Dubuisson and Dennis pour le rat, par rapport à la

technique décrite par Murray (1988) pour la souris, mesurant uniquement le comportement de « lèchement ».

En résumé, les hypothèses étaient que l'absence de la fonction reliée au récepteur ER α devait empêcher l'augmentation de la libération de peptides opioïdes au niveau central, tandis que les souris ER α KO devaient démontrer un comportement nociceptif supérieur à celui des souris ER α WT. Les résultats obtenus sont pourtant nuancés. Lorsque l'on mesure la réponse nociceptive par rapport à la technique décrite par Hunskaar et Hole (1985) (mesure du comportement de « lèchement » chez la souris), les résultats obtenus avec le modèle agoniste se rapprochent de cette hypothèse puisque le comportement douloureux est diminué durant l'interphase en comparaison au contrôle. Cependant, chez le modèle de souris ER α KO, seulement les souris mâles produisent un effet concordant à celui supposé par l'hypothèse de début d'étude, donc les mâles ER α KO montrent un comportement douloureux augmenté par rapport aux souris ER α WT durant l'interphase.

D'un autre point de vue, si l'on considérait les résultats observés lors de l'interphase du score nociceptif, c'est-à-dire l'augmentation du comportement nociceptif chez les souris ayant reçues l'agoniste du récepteur ER α (PPT), il pourrait être suggéré que la progestérone présente chez les souris ER α KO et non chez les souris OVX+PPT, est en cause dans cette variation du comportement nociceptif. Comme mentionné plus haut, la progestérone affecte l'efficacité des récepteurs estrogéniques, mais aussi se transforme en neurostéroïde ayant aussi un effet important sur la modulation de la douleur.

Interphase : Variation entre les sexes lors de l'interphase du test à la formaline chez les souris ER α KO

Le rôle du récepteur ER α semble être le même chez le mâle et chez la femelle ER α KO lors de la phase 1 du test à la formaline. Cependant, lors de l'interphase, une augmentation du comportement douloureux a été observée chez les femelles ER α KO, en comparaison avec les femelles de type sauvages (WT). Alors que chez le mâle, durant l'interphase, aucune augmentation n'a pas été observée. Cette différence entre les sexes, pendant l'interphase du test à la formaline, suggère que le rôle du récepteur ER α , au niveau des mécanismes de contrôle nociceptif associés à l'interphase serait dépendant du sexe de la souris. Cette variation entre les sexes peut s'expliquer de plusieurs façons.

Premièrement, il a été mentionné dans la section 1.4.2 que les mécanismes neurophysiologiques associés à l'interphase sont distincts entre les mâles et les femelles. Gaumond et al. (2007) ont démontré que ces mécanismes sont non-opioïdiques chez les mâles, puisque le comportement nociceptif associé à l'interphase n'est que très peu modulée par les antagonistes des récepteurs opioïdes. À l'inverse, ces mécanismes seraient vraisemblablement associés au système opioïde chez les femelles, principalement régis par les récepteurs κ et δ , puisque le comportement nociceptif des rates est altéré par l'injection d'antagonistes spécifiques à ces récepteurs. Ainsi, puisque le récepteur ER α module la libération de peptides opioïdes [Micevych et al., 2003], son absence affecte davantage la nociception durant l'interphase du test à la formaline chez la femelle que chez le mâle. Cette variation entre les sexes pourrait expliquer la variabilité entre les

mâles et les femelles de ce projet, particulièrement en considérant qu'il a été démontré que le récepteur ER α module la libération de peptides opioïdes [Micevych et al., 2003]. Ce rôle particulier du récepteur ER α pourrait être impliqué dans les mécanismes neurophysiologiques d'inhibition endogène de la douleur chez la femelle. Puisque les mécanismes sont non-opioïdergiques chez les mâles, l'interphase ne serait pas modulée par ce récepteur.

Deuxièmement, l'action spécifique aux femelles du récepteur ER α dans la réduction du comportement douloureux de l'interphase pourrait s'expliquer par le type d'animal utilisé. Nous avons soulevé plus tôt la variabilité inter-espèce et inter-souche impliquée lors d'expérimentations sur la douleur. Il est donc important de considérer le fait qu'il n'y a pas de différence entre les mâles SHAM et les mâles castrés (CAST), ce qui permet de croire à une absence d'effet des hormones sexuelles (ni testostérone ni estrogène) de façon générale chez cette souche. De plus, Spooner et al. (2007) n'ont pas observé de variations durant l'interphase chez les souris mâles ER β KO (de souche C57BL/6j), bien qu'il y ait présence d'une différence considérable chez les femelles ER β KO.

Troisièmement, il est aussi suggéré que la structure de la SGPA pourrait expliquer cette divergence entre les mâles et les femelles, puisque le système PAG-RVM (un centre dominant du contrôle inhibiteur descendant de la douleur) est sujet à un dimorphisme sexuel [Lloyd & Murphy, 2006] et que ce circuit est essentiel à l'analésie opioïdergique et donc à l'interphase.

Ces résultats démontrent qu'il faut être vigilant en ce qui concerne les souris mâles, puisque nous avons démontré que les comportements douloureux entre les mâles et les femelles sont très différents de ce qui a été observé dans le passé (il n'y a plus de différence visible). De plus, il est impératif d'être prudent concernant le type d'analyse utilisé (score comportemental décrit par Dubuisson and Dennis (1977) vs mesure unique du comportement de « lèchement » décrit par Hunskaar and Hole (1987)), puisque le score comportemental ne représente pas toujours les comportements douloureux de façon précise. De plus, les résultats de Charlet et al. (données non publiées) démontrent que les souris n'ont jamais un poids égal posé sur chacune de ses pattes arrière lors du test à la formaline, ce qui invalide, en partie, l'utilité du score « 0 » chez la souris. Donc, lorsqu'une différence est observée entre deux scores nociceptifs inférieurs à un (tel qu'observé Fig. 11 entre les souris OVX et OVX+PPT lors de l'interphase) on peut suspecter un artéfact d'interprétation des données. Ce qui confirme une validité supérieure, chez la souris, de l'analyse du comportement de « lèchement » uniquement décrite par Hunskaar et Hole (1987).

Finalement, il est important de mentionner que puisque les femelles subissent une intervention chirurgicale (ovariectomie et insertion d'un implant) et pas les mâles, il est impossible de les comparer entre eux en regard des différences entre les sexes.

Phase 2 :

Tout comme décrit avec le récepteur $ER\beta$, les comportements nociceptifs de la phase 2, particulièrement tardive (2b), les souris injectées avec le PPT ont présenté des comportements nociceptifs moindres en comparaison avec les souris OVX. L'effet anti-inflammatoire associé au

récepteur ER α n'a jamais été observé avant. Cependant, il est important de mentionner que ces variations de la réponse nociceptive lors de la phase inflammatoire n'ont pas été observées chez les souris ER α KO. La différence majeure qui existe entre le modèle utilisant l'injection d'agoniste suite à l'ovariectomie et celui des souris transgéniques est, comme mentionné plus haut, l'ajout de progestérone via un implant chez les souris transgéniques. La progestérone possède un effet considérable sur la capacité analgésique de l'estradiol lors de la phase 2 du test à la formaline [Kuba et al., 2005]. Il est même suggéré que la progestérone renverse l'effet anti-inflammatoire de l'estradiol durant cette phase. Cette action antagoniste de la progestérone sur l'estradiol pourrait expliquer la présence d'une variation des réponses nociceptives de la phase inflammatoire tardive (2b) entre le modèle d'injection d'agoniste et le modèle de souris transgéniques (ER α KO ou ER β KO).

7.4 Critique du protocole

Le protocole utilisé durant cette expérimentation a été choisi du à ces caractéristiques triphasiques représentant la douleur aiguë, tonique ainsi que le contrôle inhibiteur de la douleur. Cependant, plusieurs points sont à tenir compte concernant les différentes techniques d'analyse du test à la formaline. Comme mentionné au cours de l'introduction, le test à la formaline a d'abord été mis au point sur le rat et le chat [Dubuisson & Dennis, 1977]. L'utilisation des souris est cependant de plus en plus fréquente et il est d'intérêt de considérer leur différence de comportement afin d'effectuer des évaluations justes. Dans l'expérimentation présentée dans ce mémoire, il a été décidé, dans un premier temps, d'observer le score nociceptif, c'est-à-dire le score pondéré présenté par Dubuisson et Dennis (1977). Cette méthode a été sélectionnée

puisque'elle est utilisée par la plupart des autres équipes de recherche s'intéressant aux rôles des hormones gonadiques et des récepteurs estrogéniques dans la douleur. Nous avons ajouté à cette mesure les comportements de « trépidement » et de « lèchement ». La mesure du comportement de « lèchement » était d'autant plus importante puisqu'il s'agit du comportement de référence utilisé lors du test à la formaline chez la souris [Murray et al., 1988]. L'ajout du comportement de « trépidement » permettait d'ajouter la composante reliant le comportement au mécanisme neurophysiologique spinal et supraspinal [Ceccarelli et al., 2003]. Il est évident qu'il aurait été possible d'utiliser plusieurs autres techniques d'analyse, particulièrement avec un modèle comme la souris, où la combinaison des comportements de « trépidement » et de « lèchement » aurait pu être faite. Dans le même ordre d'idée, certaines équipes associent un score pondéré uniquement aux comportements de « trépidement » et de « lèchement » [Watson et al., 1997], cette technique d'analyse aurait aussi été efficace. Dans ces deux cas, ces techniques auraient permis de passer outre la discrimination des scores pondérés 0 et 1, tout en conservant la pondération associée aux différents comportements. En effet, il a été décrit que cette technique de pondération était optimale chez le rat [Watson et al., 1997].

De plus, lors de l'expérimentation présente, le comportement des animaux a été évalué visuellement de façon directe. Cependant, Langford et al. (2006) ont démontré l'influence de la présence d'un observateur directement dans la salle d'expérimentation sur les tests comportementaux chez les rongeurs. Il est évident qu'il serait préférable de filmer les animaux afin de pouvoir exclure cet élément de variation. Cependant, puisque toutes les souris ont été

évaluées de la même façon, nous ne pensons pas que cette variable ait affecté de façon majeure les résultats obtenus.

Un dernier point important est l'utilisation à la fois d'éthanol et de DMSO comme solvant du PPT. Puisque le PPT n'était pas un composé solvable dans la concentration initiale d'éthanol, nous avons décidé, dans un premier temps d'augmenter le volume final de la solution injectée afin de pouvoir dissoudre la quantité nécessaire de PPT (n=7). Cependant, afin de vérifier que le volume n'avait pas d'effet considérable sur le test à la formaline, nous avons modifié le solvant pour le DMSO qui permettait une meilleure solubilité du produit et donc un volume final d'injection standard (n=7). Au final, les résultats obtenus lors de l'utilisation du solvant éthanol ou DMSO n'étant pas différent, les deux groupes ont donc été fusionnés pour former un seul et même groupe (n=14).

Conclusion

CHAPITRE 8 : CONCLUSION

Cette étude a permis de démontrer l'importance des deux sous-récepteurs estrogéniques sur les mécanismes neurophysiologiques de la douleur, tout en démontrant leur distinction quant à leur façon de moduler la transmission et l'inhibition de la douleur.

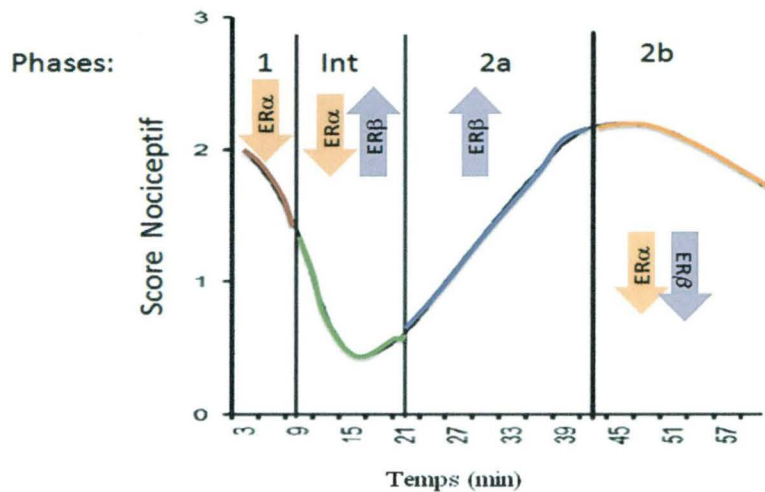


Figure 22. Graphique résumé de l'implication du récepteur ERα et ERβ dans la modulation de la douleur

Graphique résumé des résultats au test à la formaline des souris femelles injectées avec l'agoniste spécifique du récepteur ERα (OVX+PPT) en comparaison des souris contrôles (souris ovariectomisées, OVX). Les flèches représentent les résultats statistiquement significatifs. La direction des flèches représente l'augmentation (↑) ou la diminution (↓) de la réponse nociceptive par rapport aux souris contrôles (OVX).

Les résultats ont permis de confirmer l'effet hyperalgésique du récepteur ER β par la modulation des voies de contrôles inhibitrices. Nous avons de plus démontré pour la première fois dans un modèle comportemental de douleur l'effet hypoalgésique du récepteur ER α par la modulation des mécanismes de transmission et d'inhibition de la douleur.

Il est évident qu'il serait nécessaire de mieux caractériser l'effet précis de ces récepteurs sur les centres supérieurs régissant les mécanismes d'inhibition de la douleur ainsi que les mécanismes neurophysiologiques spinaux. Particulièrement, la régulation de la libération des neurotransmetteurs monoaminergiques ainsi que des peptides algogènes.

De plus, les récepteurs estrogéniques présents au niveau de la membrane sont de plus en plus discutés dans la littérature, particulièrement au niveau neurophysiologique et dans les mécanismes de douleur. Entre autres, il a été déterminé que les effets du récepteur ER α sur les neurones de petits calibres des DRG se produisent par des récepteurs situés au niveau de la membrane. Il serait donc pertinent de mieux caractériser leur rôle dans la douleur, particulièrement dans l'objectif de pouvoir les cibler spécifiquement dans le traitement de la douleur.

On parle de plus en plus des neurostéroïdes, des stéroïdes synthétisés à même le SNC, et de leur rôle actif dans la modulation de la douleur. Puisque ces molécules sont dérivées des stéroïdes connus, il serait extrêmement intéressant d'approfondir le rôle des hormones sexuelles gonadiques sur la synthèse et les mécanismes d'action des stéroïdes neuroactifs. Toujours dans

le but de mieux adapter les traitements pharmacologiques basés sur la modulation de ces neurostéroïdes.

Bibliographie

- [Abbott et al., 1981] Abbott, F. V., Franklin, K. B., Ludwick, R. J., & Melzack, R. (1981). Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. *Pharmacol Biochem Behav*, 15(4), 637–640.
- [Abbott et al., 1995] Abbott, F. V., Franklin, K. B., & Westbrook, R. F. (1995). The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, 60(1), 91–102.
- [Abbott et al., 1982] Abbott, F. V., Melzack, R., & Samuel, C. (1982). Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Exp Neurol*, 75(3), 644–651.
- [Aloisi, 2003] Aloisi, A. M. (2003). Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity. *Clin J Pain*, 19(3), 168–174.
- [Aloisi & Ceccarelli, 2000] Aloisi, A. M. & Ceccarelli, I. (2000). Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. *Neuroscience*, 95(2), 559–566.
- [Alves et al., 1998a] Alves, S. E., Lopez, V., McEwen, B. S., & Weiland, N. G. (1998a). Differential colocalization of estrogen receptor beta (erbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an

- immunocytochemical study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3281–3286.
- [Alves et al., 1998b] Alves, S. E., Weiland, N. G., Hayashi, S., & McEwen, B. S. (1998b). Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progestin receptors within the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, 391(3), 322–334.
- [Amandusson et al., 1999] Amandusson, A., Hallbeck, M., Hallbeck, A. L., Hermanson, O., & Blomqvist, A. (1999). Estrogen-induced alterations of spinal cord enkephalin gene expression. *Pain*, 83(2), 243–248.
- [Amandusson et al., 1995] Amandusson, A., Hermanson, O., & Blomqvist, A. (1995). Estrogen receptor-like immunoreactivity in the medullary and spinal dorsal horn of the female rat. *Neurosci Lett*, 196(1-2), 25–28.
- [Amandusson et al., 1996] Amandusson, A., Hermanson, O., & Blomqvist, A. (1996). Colocalization of oestrogen receptor immunoreactivity and preproenkephalin mrna expression to neurons in the superficial laminae of the spinal and medullary dorsal horn of rats. *Eur J Neurosci*, 8(11), 2440–2445.
- [Basbaum & Woolf, 1999] Basbaum, A. I. & Woolf, C. J. (1999). Pain. *Curr Biol*, 9(12), R429–R431.
- [Baulieu, 1998] Baulieu, E. E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), 963–987.

- [Beaulieu, 2005] Beaulieu, P. (2005). *Pharmacologie de la douleur*. Montreal: Presses de l'Universite de Montreal.
- [Belelli & Lambert, 2005] Belelli, D. & Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the gaba(a) receptor. *Nat Rev Neurosci*, 6(7), 565–575.
- [Berge et al., 1991] Berge, O. G., Garcia-Cabrera, I., & Furset, K. (1991). Hyperbaric exposure and morphine alter the pattern of behavior in the formalin test. *Pharmacol Biochem Behav*, 40(2), 197–201.
- [Berkley, 1997] Berkley, K. J. (1997). Sex differences in pain. *Behav Brain Sci*, 20(3), 371–80; discussion 435–513.
- [Besson, 1990] Besson, J. M. (1990). *Serotonin and pain : proceedings of the International Symposium on Serotonin and Pain, held in La Roque-Gageac, from 17-21 September 1989*, volume 879. Amsterdam ; New York : New York, NY, USA.
- [Besson & Chaouch, 1987] Besson, J. M. & Chaouch, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*, 67(1), 67–186.
- [Bethea et al., 2002] Bethea, C. L., Lu, N. Z., Gundlah, C., & Streicher, J. M. (2002). Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Front Neuroendocrinol*, 23(1), 41–100.
- [Biegon et al., 1983] Biegon, A., Reches, A., Snyder, L., & McEwen, B. S. (1983). Serotonergic and noradrenergic receptors in the rat brain:

modulation by chronic exposure to ovarian hormones. *Life Sci*, 32(17), 2015–2021.

- [Blurton-Jones & Tuszynski, 2002] Blurton-Jones, M. & Tuszynski, M. H. (2002). Estrogen receptor-beta colocalizes extensively with parvalbumin-labeled inhibitory neurons in the cortex, amygdala, basal forebrain, and hippocampal formation of intact and ovariectomized adult rats. *J Comp Neurol*, 452(3), 276–287.
- [Bockstaele et al., 1991] Bockstaele, E. J. V., Aston-Jones, G., Pieribone, V. A., Ennis, M., & Shipley, M. T. (1991). Subregions of the periaqueductal gray topographically innervate the rostral ventral medulla in the rat. *J Comp Neurol*, 309(3), 305–327.
- [Bonnet, 1991] Bonnet, F. (1991). *La Douleur en milieu chirurgical*, volume 4. Paris: Arnette.
- [Brasseur et al., 1997] Brasseur, L., Chauvin, M., & Guilbaud, G. (1997). *Douleurs : bases fondamentales, pharmacologie, douleurs aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques*. Paris: Maloine.
- [Brown et al., 1996] Brown, L. L., Pasi, S., & Etgen, A. M. (1996). Estrogen regulation of mu opioid receptor density in hypothalamic premammillary nuclei. *Brain Res*, 742(1-2), 347–351.
- [Budai & Fields, 1998] Budai, D. & Fields, H. L. (1998). Endogenous opioid peptides acting at mu-opioid receptors in the dorsal horn contribute to

- midbrain modulation of spinal nociceptive neurons. *J Neurophysiol*, 79(2), 677–687.
- [Budai et al., 1998] Budai, D., Harasawa, I., & Fields, H. L. (1998). Midbrain periaqueductal gray (pag) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. *J Neurophysiol*, 80(5), 2244–2254.
- [Calvino & Grilo, 2006] Calvino, B. & Grilo, R. M. (2006). Central pain control. *Joint Bone Spine*, 73(1), 10–16.
- [Cameron et al., 1995] Cameron, A. A., Khan, I. A., Westlund, K. N., & Willis, W. D. (1995). The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. ii. descending projections. *J Comp Neurol*, 351(4), 585–601.
- [Catley et al., 2008] Catley, M. C., Birrell, M. A., Hardaker, E. L., de Alba, J., Farrow, S., Haj-Yahia, S., & Belvisi, M. G. (2008). Estrogen receptor beta: expression profile and possible anti-inflammatory role in disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 326(1), 83–88.
- [Ceccarelli et al., 2004] Ceccarelli, I., Fiorenzani, P., Grasso, G., Lariviere, W. R., Massafra, C., Massai, L., Muscettola, M., & Aloisi, A. M. (2004). Estrogen and mu-opioid receptor antagonists counteract the 17 beta-estradiol-induced licking increase and interferon-gamma reduction occurring during the formalin test in male rats. *Pain*, 111(1-2), 181–190.

- [Ceccarelli et al., 2003] Ceccarelli, I., Fiorenzani, P., Massafra, C., & Aloisi, A. M. (2003). Long-term ovariectomy changes formalin-induced licking in female rats: the role of estrogens. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 24.
- [Ceccarelli et al., 2006] Ceccarelli, I., Fiorenzani, P., Massafra, C., & Aloisi, A. M. (2006). Repeated nociceptive stimulation induces different behavioral and neuronal responses in intact and gonadectomized female rats. *Brain Res*, 1106(1), 142–149.
- [Chaban et al., 2003] Chaban, V. V., Mayer, E. A., Ennes, H. S., & Micevych, P. E. (2003). Estradiol inhibits atp-induced intracellular calcium concentration increase in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience*, 118(4), 941–948.
- [Chaban & Micevych, 2005] Chaban, V. V. & Micevych, P. E. (2005). Estrogen receptor-alpha mediates estradiol attenuation of atp-induced ca^{2+} signaling in mouse dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res*, 81(1), 31–37.
- [Chomicka, 1986] Chomicka, L. K. (1986). Effect of oestradiol on the responses of regional brain serotonin to stress in the ovariectomized rat. *J Neural Transm*, 67(3-4), 267–273.
- [Coderre et al., 1993] Coderre, T. J., Fundytus, M. E., McKenna, J. E., Dalal, S., & Melzack, R. (1993). The formalin test: a validation of the

- weighted-scores method of behavioural pain rating. *Pain*, 54(1), 43–50.
- [Cone et al., 1981] Cone, R. I., Davis, G. A., & Goy, R. W. (1981). Effects of ovarian steroids on serotonin metabolism within grossly dissected and microdissected brain regions of the ovariectomized rat. *Brain Res Bull*, 7(6), 639–644.
- [Couse & Korach, 1999a] Couse, J. F. & Korach, K. S. (1999a). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, 20(3), 358–417.
- [Couse & Korach, 1999b] Couse, J. F. & Korach, K. S. (1999b). Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol (Paris)*, 60(2), 143–148.
- [Coutaux et al., 2005] Coutaux, A., Adam, F., Willer, J.-C., & Bars, D. L. (2005). Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, 72(5), 359–371.
- [Craft, 2003] Craft, R. M. (2003). Sex differences in opioid analgesia: "from mouse to man". *Clin J Pain*, 19(3), 175–186.
- [Craft, 2007] Craft, R. M. (2007). Modulation of pain by estrogens. *Pain*, 132 Suppl 1, S3–12.
- [Craft et al., 2004] Craft, R. M., Mogil, J. S., & Aloisi, A. M. (2004). Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur J Pain*, 8(5), 397–411.

- [Crowley et al., 1979] Crowley, W. R., O'Donohue, T. L., Muth, E. A., & Jacobowitz, D. M. (1979). Effects of ovarian hormones on levels of luteinizing hormone in plasma and on serotonin concentrations in discrete brain nuclei. *Brain Res Bull*, 4(4), 571–574.
- [Cui et al., 1999] Cui, M., Feng, Y., McAdoo, D. J., & Willis, W. D. (1999). Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(2), 868–876.
- [Cvoro et al., 2008] Cvoro, A., Tatomer, D., Tee, M.-K., Zogovic, T., Harris, H. A., & Leitman, D. C. (2008). Selective estrogen receptor-beta agonists repress transcription of proinflammatory genes. *J Immunol*, 180(1), 630–636.
- [Dawson-Basoa & Gintzler, 1993] Dawson-Basoa, M. B. & Gintzler, A. R. (1993). 17-beta-estradiol and progesterone modulate an intrinsic opioid analgesic system. *Brain Res*, 601(1-2), 241–245.
- [Dennis & Melzack, 1980] Dennis, S. G. & Melzack, R. (1980). Pain modulation by 5-hydroxytryptaminergic agents and morphine as measured by three pain tests. *Exp Neurol*, 69(2), 260–270.
- [Dickenson & Sullivan, 1987] Dickenson, A. H. & Sullivan, A. F. (1987). Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat:

- differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain*, 30(3), 349–360.
- [DonCarlos et al., 1995] DonCarlos, L. L., Malik, K., & Morrell, J. I. (1995). Region-specific effects of ovarian hormones on estrogen receptor immunoreactivity. *Neuroreport*, 6(15), 2054–2058.
- [Dubuisson & Dennis, 1977] Dubuisson, D. & Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(2), 161–174.
- [Eberhart et al., 1985] Eberhart, J. A., Morrell, J. I., Krieger, M. S., & Pfaff, D. W. (1985). An autoradiographic study of projections ascending from the midbrain central gray, and from the region lateral to it, in the rat. *J Comp Neurol*, 241(3), 285–310.
- [Eckersell et al., 1998] Eckersell, C. B., Popper, P., & Micevych, P. E. (1998). Estrogen-induced alteration of mu-opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. *J Neurosci*, 18(10), 3967–3976.
- [Evrard, 2006] Evrard, H. C. (2006). Estrogen synthesis in the spinal dorsal horn: a new central mechanism for the hormonal regulation of pain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(2), R291–R299.

- [Fanselow, 1984] Fanselow, M. S. (1984). Shock-induced analgesia on the formalin test: effects of shock severity, naloxone, hypophysectomy, and associative variables. *Behav Neurosci*, 98(1), 79–95.
- [Filardo, 2002] Filardo, E. J. (2002). Epidermal growth factor receptor (egfr) transactivation by estrogen via the g-protein-coupled receptor, gpr30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 80(2), 231–238.
- [Fillingim & Gear, 2004] Fillingim, R. B. & Gear, R. W. (2004). Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings. *Eur J Pain*, 8(5), 413–425.
- [Fillingim et al., 1997] Fillingim, R. B., Maixner, W., Girdler, S. S., Light, K. C., Harris, M. B., Sheps, D. S., & Mason, G. A. (1997). Ischemic but not thermal pain sensitivity varies across the menstrual cycle. *Psychosom Med*, 59(5), 512–520.
- [Flor, 2002] Flor, H. (2002). Painful memories. can we train chronic pain patients to 'forget' their pain? *EMBO Rep*, 3(4), 288–291.
- [Frasor et al., 2003] Frasor, J., Barnett, D. H., Danes, J. M., Hess, R., Parlow, A. F., & Katzenellenbogen, B. S. (2003). Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (er) alpha activity by erbeta in the uterus. *Endocrinology*, 144(7), 3159–3166.

- [Frye & Duncan, 1996] Frye, C. A. & Duncan, J. E. (1996). Estradiol benzoate potentiates neuroactive steroids' effects on pain sensitivity. *Pharmacol Biochem Behav*, 53(1), 27–32.
- [Gackenhimer et al., 2005] Gackenhimer, S. L., Suter, T. M., Pintar, J. E., Quimby, S. J., Wheeler, W. J., Mitch, C. H., Gehlert, D. R., & Statnick, M. A. (2005). Localization of opioid receptor antagonist [3h]-ly255582 binding sites in mouse brain: comparison with the distribution of mu, delta and kappa binding sites. *Neuropeptides*, 39(6), 559–567.
- [Gardell et al., 2008] Gardell, L. R., Hyldtoft, L., Tredici, A. L. D., Andersen, C. B., Fairbairn, L. C., Lund, B. W., Gustafsson, M., Brann, M. R., Olsson, R., & Piu, F. (2008). Differential modulation of inflammatory pain by a selective estrogen receptor beta agonist. *Eur J Pharmacol*, 592(1-3), 158–159.
- [Gaumond et al., 2002] Gaumond, I., Arsenault, P., & Marchand, S. (2002). The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res*, 958(1), 139–145.
- [Gaumond et al., 2005] Gaumond, I., Arsenault, P., & Marchand, S. (2005). Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res*, 1052(1), 105–111.

- [Gaumond et al., 2007] Gaumond, I., Spooner, M.-F., & Marchand, S. (2007). Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. *Neuroscience*, 146(1), 366–374.
- [Gebhart, 2004] Gebhart, G. F. (2004). Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(8), 729–737.
- [Goodman et al., 2001] Goodman, L. S., Hardman, J. G., Limbird, L. E., & Gilman, A. G. (2001). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, volume 10th. New York: McGraw-Hill.
- [Gordon & Soliman, 1994] Gordon, F. T. & Soliman, M. R. (1994). Diurnal variation in the acute effects of estradiol and progesterone on beta-endorphin and met-enkephalin levels in specific brain regions of ovariectomized rats. *Pharmacology*, 49(3), 192–198.
- [Gordon & Soliman, 1996] Gordon, F. T. & Soliman, M. R. (1996). The effects of estradiol and progesterone on pain sensitivity and brain opioid receptors in ovariectomized rats. *Horm Behav*, 30(3), 244–250.
- [Greenspan & Gardner, 2004] Greenspan, F. S. & Gardner, D. G. (2004). *Basic & clinical endocrinology*, volume 7th. New York ; Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- [Grumbach & Auchus, 1999] Grumbach, M. M. & Auchus, R. J. (1999). Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(12), 4677–4694.

- [Guirimand & Bars, 1996] Guirimand, F. & Bars, D. L. (1996). [physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 15(7), 1048–1079.
- [Gundlah et al., 2001] Gundlah, C., Lu, N. Z., Mirkes, S. J., & Bethea, C. L. (2001). Estrogen receptor beta (erbeta) mrna and protein in serotonin neurons of macaques. *Brain Res Mol Brain Res*, 91(1-2), 14–22.
- [Hall et al., 2002] Hall, J. M., McDonnell, D. P., & Korach, K. S. (2002). Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol*, 16(3), 469–486.
- [Handa et al., 1996] Handa, R. J., Kerr, J. E., DonCarlos, L. L., McGivern, R. F., & Hejna, G. (1996). Hormonal regulation of androgen receptor messenger rna in the medial preoptic area of the male rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 39(1-2), 57–67.
- [Hasanein et al., 2008] Hasanein, P., Mirazi, N., & Javanmardi, K. (2008). Gabaa receptors in the central nucleus of amygdala (cea) affect on pain modulation. *Brain Res*, 1241, 36–41.
- [Heinricher et al., 2008] Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., & Lumb, B. M. (2008). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*.
- [Henry et al., 1999] Henry, J. L., Yashpal, K., Pitcher, G. M., &Coderre, T. J. (1999). Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. *Pain*, 82(1), 57–63.

- [Herbison & Theodosios, 1992] Herbison, A. E. & Theodosios, D. T. (1992). Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience*, 50(2), 283–298.
- [Hewitt & Korach, 2003] Hewitt, S. C. & Korach, K. S. (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction*, 125(2), 143–149.
- [Holtzman et al., 1997] Holtzman, D. A., Brooks, P. J., Pfaff, D. W., & Schwartz-Giblin, S. (1997). Preproenkephalin mRNA is regulated by an interaction between steroid hormones and nociceptive stimulation. *J Neuroendocrinol*, 9(12), 913–922.
- [Honjo et al., 1989] Honjo, H., Ogino, Y., Naitoh, K., Urabe, M., Kitawaki, J., Yasuda, J., Yamamoto, T., Ishihara, S., Okada, H., & Yonezawa, T. (1989). In vivo effects by estrone sulfate on the central nervous system-senile dementia (alzheimer's type). *J Steroid Biochem*, 34(1-6), 521–525.
- [Hrabovszky et al., 1998] Hrabovszky, E., Kallás, I., Hajszán, T., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., & Liposits, Z. (1998). Expression of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology*, 139(5), 2600–2604.

- [Hunskaar et al., 1986] Hunskaar, S., Berge, O. G., & Hole, K. (1986). Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain*, 25(1), 125–132.
- [Hunskaar et al., 1985] Hunskaar, S., Fasmer, O. B., & Hole, K. (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods*, 14(1), 69–76.
- [Hunskaar & Hole, 1987] Hunskaar, S. & Hole, K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30(1), 103–114.
- [IASP, 1994] IASP (1994). *Classification of Chronic Pain*. IASP Press, Seattle, second edition edition.
- [IASP, 2004] IASP (2004). *The Genetics of Pain*, volume 28. Seattle: IASP Press, Seattle.
- [Isgor et al., 2002] Isgor, C., Huang, G. C., Akil, H., & Watson, S. J. (2002). Correlation of estrogen beta-receptor messenger rna with endogenous levels of plasma estradiol and progesterone in the female rat hypothalamus, the bed nucleus of stria terminalis and the medial amygdala. *Brain Res Mol Brain Res*, 106(1-2), 30–41.
- [Jancso et al., 1977] Jancso, G., Kiraly, E., & Jancso-Gaabor, A. (1977). Pharmacologically induced selective degeneration of

- chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, 270(5639), 741–743.
- [Jensen & DeSombre, 1973] Jensen, E. V. & DeSombre, E. R. (1973). Estrogen-receptor interaction. *Science*, 182(108), 126–134.
- [Johnson & Crowley, 1983] Johnson, M. D. & Crowley, W. R. (1983). Acute effects of estradiol on circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations and on serotonin turnover in individual brain nuclei. *Endocrinology*, 113(6), 1935–1941.
- [Julius & Basbaum, 2001] Julius, D. & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210.
- [Kelly et al., 1992] Kelly, M. J., Loose, M. D., & Ronnekleiv, O. K. (1992). Estrogen suppresses mu-opioid- and gabab-mediated hyperpolarization of hypothalamic arcuate neurons. *J Neurosci*, 12(7), 2745–2750.
- [Kelly et al., 1977] Kelly, M. J., Moss, R. L., & Dudley, C. A. (1977). The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res*, 30(1), 53–64.
- [Kest et al., 1999] Kest, B., Wilson, S. G., & Mogil, J. S. (1999). Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(3), 1370–1375.

- [King et al., 1986] King, T. S., Steger, R. W., & Morgan, W. W. (1986). Effect of ovarian steroids to stimulate region-specific hypothalamic 5-hydroxytryptamine synthesis in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 42(4), 344–350.
- [Koch, 1990] Koch, M. (1990). Effects of treatment with estradiol and parental experience on the number and distribution of estrogen-binding neurons in the ovariectomized mouse brain. *Neuroendocrinology*, 51(5), 505–514.
- [Krezel et al., 2001] Krezel, W., Dupont, S., Krust, A., Chambon, P., & Chapman, P. F. (2001). Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(21), 12278–12282.
- [Kuba et al., 2005] Kuba, T., Kemen, L. M., & Quinones-Jenab, V. (2005). Estradiol administration mediates the inflammatory response to formalin in female rats. *Brain Res*, 1047(1), 119–122.
- [Kuba et al., 2006] Kuba, T., Wu, H.-B. K., Nazarian, A., Festa, E. D., Barr, G. A., Jenab, S., Inturrisi, C. E., & Quinones-Jenab, V. (2006). Estradiol and progesterone differentially regulate formalin-induced nociception in ovariectomized female rats. *Horm Behav*, 49(4), 441–449.
- [Kuiper et al., 1997] Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., HÅggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1997).

- Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3), 863–870.
- [Kuiper et al., 1998] Kuiper, G. G., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., & Gustafsson, J. A. (1998). The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 19(4), 253–286.
- [Kumazawa, 1990] Kumazawa, T. (1990). Functions of the nociceptive primary neurons. *Jpn J Physiol*, 40(1), 1–14.
- [Ladisich, 1974] Ladisich, W. (1974). Effect of progesterone on regional 5-hydroxytryptamine metabolism in the rat brain. *Neuropharmacology*, 13(9), 877–883.
- [Lagrange et al., 1995] Lagrange, A. H., Ronnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (1995). Estradiol-17 beta and mu-opioid peptides rapidly hyperpolarize gnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? *Endocrinology*, 136(5), 2341–2344.
- [Lambert et al., 2003] Lambert, J. J., Belelli, D., Peden, D. R., Vardy, A. W., & Peters, J. A. (2003). Neurosteroid modulation of gabaa receptors. *Prog Neurobiol*, 71(1), 67–80.
- [Lariviere et al., 2001] Lariviere, W. R., Chesler, E. J., & Mogil, J. S. (2001). Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or

- background genotype? *J Pharmacol Exp Ther*, 297(2), 467–473.
- [Laubert et al., 1991] Laubert, A. H., Mobbs, C. V., Muramatsu, M., & Pfaff, D. W. (1991). Estrogen receptor messenger rna expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology*, 129(6), 3180–3186.
- [Leventhal et al., 2006] Leventhal, L., Brandt, M. R., Cummons, T. A., Piesla, M. J., Rogers, K. E., & Harris, H. A. (2006). An estrogen receptor-beta agonist is active in models of inflammatory and chemical-induced pain. *Eur J Pharmacol*, 553(1-3), 146–148.
- [Lin et al., 1996a] Lin, Q., Peng, Y. B., & Willis, W. D. (1996a). Antinociception and inhibition from the periaqueductal gray are mediated in part by spinal 5-hydroxytryptamine(1a) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 276(3), 958–967.
- [Lin et al., 1996b] Lin, Q., Peng, Y. B., & Willis, W. D. (1996b). Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and gaba is reduced during central sensitization. *J Neurophysiol*, 76(2), 1005–1014.
- [Lin et al., 1996c] Lin, Q., Peng, Y. B., & Willis, W. D. (1996c). Role of gaba receptor subtypes in inhibition of primate spinothalamic tract neurons: difference between spinal and periaqueductal gray inhibition. *J Neurophysiol*, 75(1), 109–123.

- [Loyd & Murphy, 2006] Loyd, D. R. & Murphy, A. Z. (2006). Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. *J Comp Neurol*, 496(5), 723–738.
- [Lu et al., 2001] Lu, H., Ozawa, H., Nishi, M., Ito, T., & Kawata, M. (2001). Serotonergic neurones in the dorsal raphe nucleus that project into the medial preoptic area contain oestrogen receptor beta. *J Neuroendocrinol*, 13(10), 839–845.
- [Lubahn et al., 1993] Lubahn, D. B., Moyer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. F., Korach, K. S., & Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), 11162–11166.
- [Lund et al., 2005] Lund, T. D., Rovis, T., Chung, W. C. J., & Handa, R. J. (2005). Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology*, 146(2), 797–807.
- [Mannino et al., 2007] Mannino, C. A., South, S. M., Quinones-Jenab, V., & Inturrisi, C. E. (2007). Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. *J Pain*, 8(4), 334–342.

- [Marieb, 1999] Marieb, E. N. (1999). *Anatomie et physiologie humaines*, volume 2e ed. Saint-Laurent, Quebec: Editions du Renouveau pedagogique.
- [McCall et al., 1996] McCall, W. D., Tanner, K. D., & Levine, J. D. (1996). Formalin induces biphasic activity in c-fibers in the rat. *Neurosci Lett*, 208(1), 45–48.
- [McCarthy et al., 1996] McCarthy, M. M., McDonald, C. H., Brooks, P. J., & Goldman, D. (1996). An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. *Physiol Behav*, 60(5), 1209–1215.
- [McDonnell et al., 2002] McDonnell, D. P., Wijayaratne, A., yi Chang, C., & Norris, J. D. (2002). Elucidation of the molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulators. *Am J Cardiol*, 90(1A), 35F–43F.
- [McEwen et al., 2001] McEwen, B., Akama, K., Alves, S., Brake, W. G., Bulloch, K., Lee, S., Li, C., Yuen, G., & Milner, T. A. (2001). Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), 7093–7100.
- [McEwen & Alves, 1999] McEwen, B. S. & Alves, S. E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*, 20(3), 279–307.
- [McQueen et al., 1997] McQueen, J. K., Wilson, H., & Fink, G. (1997). Estradiol-17 beta increases serotonin transporter (sert) mrna levels and the

- density of sert-binding sites in female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 45(1), 13–23.
- [Mellon et al., 2001] Mellon, S. H., Griffin, L. D., & Compagnone, N. A. (2001). Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev*, 37(1-3), 3–12.
- [Melzack & Wall, 1965] Melzack, R. & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150(699), 971–979.
- [Micevych & Sinchak, 2001] Micevych, P. & Sinchak, K. (2001). Estrogen and endogenous opioids regulate cck in reproductive circuits. *Peptides*, 22(8), 1235–1244.
- [Micevych et al., 1997] Micevych, P. E., Eckersell, C. B., Brecha, N., & Holland, K. L. (1997). Estrogen modulation of opioid and cholecystokinin systems in the limbic-hypothalamic circuit. *Brain Res Bull*, 44(4), 335–343.
- [Micevych et al., 2003] Micevych, P. E., Rissman, E. F., Gustafsson, J.-A., & Sinchak, K. (2003). Estrogen receptor-alpha is required for estrogen-induced mu-opioid receptor internalization. *J Neurosci Res*, 71(6), 802–810.
- [Migliaccio et al., 1998] Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Domenico, M. D., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., & Auricchio, F. (1998). Activation of the src/p21ras/erk pathway by

- progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J*, 17(7), 2008–2018.
- [Millan, 2002] Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66(6), 355–474.
- [Milner et al., 2001] Milner, T. A., McEwen, B. S., Hayashi, S., Li, C. J., Reagan, L. P., & Alves, S. E. (2001). Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol*, 429(3), 355–371.
- [Mitra et al., 2003] Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S., Pfaff, D. W., Ogawa, S., Rohrer, S. P., Schaeffer, J. M., McEwen, B. S., & Alves, S. E. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, 144(5), 2055–2067.
- [Mogil et al., 1998] Mogil, J. S., Lichtensteiger, C. A., & Wilson, S. G. (1998). The effect of genotype on sensitivity to inflammatory nociception: characterization of resistant (a/j) and sensitive (c57bl/6j) inbred mouse strains. *Pain*, 76(1-2), 115–125.
- [Mogil et al., 1993] Mogil, J. S., Sternberg, W. F., Kest, B., Marek, P., & Liebeskind, J. C. (1993). Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain*, 53(1), 17–25.

- [Mogil et al., 1999] Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bon, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J. O., Hain, H. S., Belknap, J. K., Hubert, L., Elmer, G. I., Chung, J. M., & Devor, M. (1999). Heritability of nociception i: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*, 80(1-2), 67–82.
- [Mogil et al., 2003] Mogil, J. S., Wilson, S. G., Chesler, E. J., Rankin, A. L., Nemmani, K. V. S., Lariviere, W. R., Groce, M. K., Wallace, M. R., Kaplan, L., Staud, R., Ness, T. J., Glover, T. L., Stankova, M., Mayorov, A., Hruby, V. J., Grisel, J. E., & Fillingim, R. B. (2003). The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8), 4867–4872.
- [Munaro, 1978] Munaro, N. I. (1978). The effect of ovarian steroids on hypothalamic 5-hydroxytryptamine neuronal activity. *Neuroendocrinology*, 26(5), 270–276.
- [Murphy et al., 1998] Murphy, D. D., Cole, N. B., Greenberger, V., & Segal, M. (1998). Estradiol increases dendritic spine density by reducing gaba neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 18(7), 2550–2559.
- [Murray et al., 1988] Murray, C. W., Porreca, F., & Cowan, A. (1988). Methodological refinements to the mouse paw formalin test. an

- animal model of tonic pain. *J Pharmacol Methods*, 20(2), 175–186.
- [Nag & Mokha, 2006] Nag, S. & Mokha, S. S. (2006). Activation of alpha2-adrenoceptors in the trigeminal region produces sex-specific modulation of nociception in the rat. *Neuroscience*, 142(4), 1255–1262.
- [Nagy et al., 1981] Nagy, J. I., Hunt, S. P., Iversen, L. L., & Emson, P. C. (1981). Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neuroscience*, 6(10), 1923–1934.
- [Nagy et al., 1983] Nagy, J. I., Iversen, L. L., Goedert, M., Chapman, D., & Hunt, S. P. (1983). Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J Neurosci*, 3(2), 399–406.
- [Nagy et al., 1980] Nagy, J. I., Vincent, S. R., Staines, W. A., Fibiger, H. C., Reisine, T. D., & Yamamura, H. I. (1980). Neurotoxic action of capsaicin on spinal substance p neurons. *Brain Res*, 186(2), 435–444.
- [Neugebauer, 2006] Neugebauer, V. (2006). Chapter 11 subcortical processing of nociceptive information: basal ganglia and amygdala. *Handb Clin Neurol*, 81, 141–158.

- [Neumann, 2008] Neumann, I. D. (2008). Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol*, 20(6), 858–865.
- [Nomura et al., 2003] Nomura, M., Korach, K. S., Pfaff, D. W., & Ogawa, S. (2003). Estrogen receptor beta (erbeta) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (eralpha) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner. *Brain Res Mol Brain Res*, 110(1), 7–14.
- [Ochi et al., 2000] Ochi, T., Motoyama, Y., & Goto, T. (2000). The analgesic effect profile of fr122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. *Eur J Pharmacol*, 391(1-2), 49–54.
- [Ogawa et al., 1998a] Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., & Pfaff, D. W. (1998a). Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology*, 139(12), 5070–5081.
- [Ogawa et al., 1998b] Ogawa, S., Washburn, T. F., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., & Pfaff, D. W. (1998b). Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. *Endocrinology*, 139(12), 5058–5069.
- [Osterlund et al., 1998] Osterlund, M., Kuiper, G. G., Gustafsson, J. A., & Hurd, Y. L. (1998). Differential distribution and regulation of estrogen

- receptor-alpha and -beta mrna within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 54(1), 175–180.
- [Paech et al., 1997] Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J., & Scanlan, T. S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors α and β at ap1 sites. *Science*, 277(5331), 1508–1510.
- [Paolo et al., 1983] Paolo, T. D., Diagle, M., Picard, V., & Barden, N. (1983). Effect of acute and chronic 17 beta-estradiol treatment on serotonin and 5-hydroxyindole acetic acid content of discrete brain nuclei of ovariectomized rat. *Exp Brain Res*, 51(1), 73–76.
- [Papka et al., 2002] Papka, R. E., Hafemeister, J., Puder, B. A., Usip, S., & Storey-Workley, M. (2002). Estrogen receptor-alpha and neural circuits to the spinal cord during pregnancy. *J Neurosci Res*, 70(6), 808–816.
- [Patrone et al., 2000] Patrone, C., Pollio, G., Vegeto, E., Enmark, E., de Curtis, I., Gustafsson, J. A., & Maggi, A. (2000). Estradiol induces differential neuronal phenotypes by activating estrogen receptor α or β . *Endocrinology*, 141(5), 1839–1845.
- [Peng et al., 1996a] Peng, Y. B., Lin, Q., & Willis, W. D. (1996a). Effects of gaba and glycine receptor antagonists on the activity and pag-induced inhibition of rat dorsal horn neurons. *Brain Res*, 736(1-2), 189–201.

- [Peng et al., 1996b] Peng, Y. B., Lin, Q., & Willis, W. D. (1996b). Involvement of alpha-2 adrenoceptors in the periaqueductal gray-induced inhibition of dorsal horn cell activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 278(1), 125–135.
- [Peng et al., 1996c] Peng, Y. B., Lin, Q., & Willis, W. D. (1996c). The role of 5-HT₃ receptors in periaqueductal gray-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 276(1), 116–124.
- [Pettersson & Gustafsson, 2001] Pettersson, K. & Gustafsson, J. A. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol*, 63, 165–192.
- [Pfaff & Keiner, 1973] Pfaff, D. & Keiner, M. (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol*, 151(2), 121–158.
- [Pietras & Szego, 1977] Pietras, R. J. & Szego, C. M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*, 265(5589), 69–72.
- [Puig & Sorkin, 1996] Puig, S. & Sorkin, L. S. (1996). Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*, 64(2), 345–355.
- [Quinones-Jenab et al., 1997] Quinones-Jenab, V., Jenab, S., Ogawa, S., Inturrisi, C., & Pfaff, D. W. (1997). Estrogen regulation of mu-opioid receptor mRNA

- in the forebrain of female rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 47(1-2), 134–138.
- [Raz et al., 2008] Raz, L., Khan, M. M., Mahesh, V. B., Vadlamudi, R. K., & Brann, D. W. (2008). Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*, 16(2-3), 140–153.
- [Rehavi et al., 1998] Rehavi, M., Goldin, M., Roz, N., & Weizman, A. (1998). Regulation of rat brain vesicular monoamine transporter by chronic treatment with ovarian hormones. *Brain Res Mol Brain Res*, 57(1), 31–37.
- [Rey, 1993] Rey, R. (1993). *Histoire de la douleur*. Paris: La Decouverte.
- [Riley et al., 1999] Riley, J. L., Robinson, M. E., Wise, E. A., & Price, D. D. (1999). A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain*, 81(3), 225–235.
- [Ronnekleiv & Kelly, 2005] Ronnekleiv, O. K. & Kelly, M. J. (2005). Diversity of ovarian steroid signaling in the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*, 26(2), 65–84.
- [Rosland et al., 1990] Rosland, J. H., Tjolsen, A., Maehle, B., & Hole, K. (1990). The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*, 42(2), 235–242.
- [Rudick & Woolley, 2000] Rudick, C. N. & Woolley, C. S. (2000). Estradiol induces a phasic fos response in the hippocampal ca1 and ca3 regions of adult female rats. *Hippocampus*, 10(3), 274–283.

- [Sah et al., 2003] Sah, P., Faber, E. S. L., Armentia, M. L. D., & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*, 83(3), 803–834.
- [Sanoja & Cervero, 2008] Sanoja, R. & Cervero, F. (2008). Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. *Eur J Pain*, 12(5), 573–581.
- [Schwarz & Pohl, 1994] Schwarz, S. & Pohl, P. (1994). Steroids and opioid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 48(4), 391–402.
- [Serpell et al., 1998] Serpell, M. G., Makin, A., & Harvey, A. (1998). Acute pain physiology and pharmacological targets: The present and future. *Acute Pain*, 1, 31–47.
- [Shah & Dostrovsky, 1980] Shah, Y. & Dostrovsky, J. O. (1980). Electrophysiological evidence for a projection of the periaqueductal gray matter to nucleus raphe magnus in cat and rat. *Brain Res*, 193(2), 534–538.
- [Shibata et al., 1989] Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., & Inoki, R. (1989). Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38(3), 347–352.
- [Shibata et al., 1986] Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Kudo, T., & Inoki, R. (1986). [studies of inflammatory pain response: related pain producing substance and endogenous opioid system]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 87(4), 405–415.

- [Shughrue et al., 1992] Shughrue, P. J., Bushnell, C. D., & Dorsa, D. M. (1992). Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology*, 131(1), 381–388.
- [Shughrue et al., 1997] Shughrue, P. J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997). Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study. *Endocrinology*, 138(12), 5476–5484.
- [Shughrue & Merchenthaler, 2001] Shughrue, P. J. & Merchenthaler, I. (2001). Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 436(1), 64–81.
- [Simerly, 1990] Simerly, R. B. (1990). Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends Neurosci*, 13(3), 104–110.
- [Simerly & Young, 1991] Simerly, R. B. & Young, B. J. (1991). Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol Endocrinol*, 5(3), 424–432.
- [Simpson et al., 1999] Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Davis, S., & Jones, M. (1999). Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer*, 6(2), 131–137.

- [Simpson et al., 1997] Simpson, E. M., Linder, C. C., Sargent, E. E., Davisson, M. T., Mobraaten, L. E., & Sharp, J. J. (1997). Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet*, 16(1), 19–27.
- [Sinchak et al., 2000] Sinchak, K., Eckersell, C., Quezada, V., Norell, A., & Micevych, P. (2000). Preproenkephalin mrna levels are regulated by acute stress and estrogen stimulation. *Physiol Behav*, 69(4-5), 425–432.
- [Sinchak & Micevych, 2001] Sinchak, K. & Micevych, P. E. (2001). Progesterone blockade of estrogen activation of mu-opioid receptors regulates reproductive behavior. *J Neurosci*, 21(15), 5723–5729.
- [Smith et al., 2006] Smith, Y. R., Stohler, C. S., Nichols, T. E., Bueller, J. A., Koeppe, R. A., & Zubieta, J.-K. (2006). Pronociceptive and antinociceptive effects of estradiol through endogenous opioid neurotransmission in women. *J Neurosci*, 26(21), 5777–5785.
- [Spooner et al., 2007] Spooner, M.-F., Robichaud, P., Carrier, J. C., & Marchand, S. (2007). Endogenous pain modulation during the formalin test in estrogen receptor beta knockout mice. *Neuroscience*, 150(3), 675–680.
- [Sufka et al., 1998] Sufka, Watson, Nothdurft, & Mogil (1998). Scoring the mouse formalin test: validation study. *Eur J Pain*, 2(4), 351–358.

- [Sugimoto et al., 1986] Sugimoto, M., Kuraishi, Y., Satoh, M., & Takagi, H. (1986). Involvement of medullary opioid-peptidergic and spinal noradrenergic systems in the regulation of formalin-induced persistent pain. *Neuropharmacology*, 25(5), 481–485.
- [Sumner & Fink, 1997] Sumner, B. E. & Fink, G. (1997). The density of 5-hydroxytryptamine_{2a} receptors in forebrain is increased at pro-oestrus in intact female rats. *Neurosci Lett*, 234(1), 7–10.
- [Sumner & Fink, 1998] Sumner, B. E. & Fink, G. (1998). Testosterone as well as estrogen increases serotonin_{2a} receptor mRNA and binding site densities in the male rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 59(2), 205–214.
- [Suzuki et al., 2004] Suzuki, R., Rygh, L. J., & Dickenson, A. H. (2004). Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci*, 25(12), 613–617.
- [Taleghany et al., 1999] Taleghany, N., Sarajari, S., DonCarlos, L. L., Gollapudi, L., & Oblinger, M. M. (1999). Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res*, 57(5), 603–615.
- [Thakur & Sharma, 2007] Thakur, M. K. & Sharma, P. K. (2007). Transcription of estrogen receptor alpha and beta in mouse cerebral cortex: effect of age, sex, 17β-estradiol and testosterone. *Neurochem Int*, 50(2), 314–321.

- [Tjolsen et al., 1991a] Tjolsen, A., Berge, O. G., & Hole, K. (1991a). Lesions of bulbo-spinal serotonergic or noradrenergic pathways reduce nociception as measured by the formalin test. *Acta Physiol Scand*, 142(2), 229–236.
- [Tjolsen et al., 1992] Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1), 5–17.
- [Tjolsen et al., 1991b] Tjolsen, A., Lund, A., & Hole, K. (1991b). Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur J Pharmacol*, 193(2), 193–201.
- [Toran-Allerand, 2004] Toran-Allerand, C. D. (2004). Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology*, 145(3), 1069–1074.
- [Torres-Lopez et al., 2002] Torres-Lopez, J. E., Ortiz, M. I., Castaneda-Hernandez, G., Alonso-Lopez, R., Asomoza-Espinosa, R., & Granados-Soto, V. (2002). Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci*, 70(14), 1669–1676.
- [Urban & Gebhart, 1997] Urban, M. O. & Gebhart, G. F. (1997). Characterization of biphasic modulation of spinal nociceptive transmission by neurotensin in the rat rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol*, 78(3), 1550–1562.

- [Vaccarino & Melzack, 1989] Vaccarino, A. L. & Melzack, R. (1989). Analgesia produced by injection of lidocaine into the anterior cingulum bundle of the rat. *Pain*, 39(2), 213–219.
- [van Weerden et al., 1992] van Weerden, W. M., Bierings, H. G., van Steenbrugge, G. J., de Jong, F. H., & Schröder, F. H. (1992). Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci*, 50(12), 857–861.
- [Vanderhorst et al., 2002] Vanderhorst, V. G. J. M., Terasawa, E., & Ralston, H. J. (2002). Estrogen receptor-alpha immunoreactive neurons in the ventrolateral periaqueductal gray receive monosynaptic input from the lumbosacral cord in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 443(1), 27–42.
- [Veiga et al., 2004] Veiga, A. P. C., Duarte, I. D. G., Avila, M. N., da Motta, P. G., Tatsuo, M. A. K. F., & Francischi, J. N. (2004). Prevention by celecoxib of secondary hyperalgesia induced by formalin in rats. *Life Sci*, 75(23), 2807–2817.
- [Vissers et al., 2003] Vissers, K., Jongh, R. D., Hoffmann, V., Heylen, R., Crul, B., & Meert, T. (2003). Internal and external factors affecting the development of neuropathic pain in rodents. is it all about pain? *Pain Pract*, 3(4), 326–342.
- [Walf & Frye, 2006] Walf, A. A. & Frye, C. A. (2006). A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for

- anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology*, 31(6), 1097–1111.
- [Wall et al., 1989] Wall, P. D., Melzack, R., & Bonica, J. J. (1989). *Textbook of pain*, volume 2nd. Edinburgh: Churchill Livingstone, \$aNew York.
- [Watson et al., 1997] Watson, G. S., Sufka, K. J., &Coderre, T. J. (1997). Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain*, 70(1), 53–58.
- [Webb et al., 1999] Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G. N., Kwok, G. R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B. S., Enmark, E., Gustafsson, J. A., Nilsson, S., & Kushner, P. J. (1999). The estrogen receptor enhances ap-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol*, 13(10), 1672–1685.
- [Weiland & Wise, 1990] Weiland, N. G. & Wise, P. M. (1990). Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain regions. *Endocrinology*, 126(2), 804–808.
- [Wheeler-Aceto & Cowan, 1991] Wheeler-Aceto, H. & Cowan, A. (1991). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)*, 104(1), 35–44.
- [Willis & Coggeshall, 1991] Willis, W. D. & Coggeshall, R. E. (1991). *Sensory mechanisms of the spinal cord*, volume 2nd. New York: Plenum Press.

- [Wilson & Mogil, 2001] Wilson, S. G. & Mogil, J. S. (2001). Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav Brain Res*, 125(1-2), 65–73.
- [Winter et al., 1962] Winter, C., Risleyand, L., Risley, E., & Nuss, G. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111, 544–547.
- [Yaksh & Kerr, 1986] Yaksh, T. L. & Kerr, F. W. L. (1986). *Spinal afferent processing*. New York: Plenum Press.
- [Yaksh & Rudy, 1978] Yaksh, T. L. & Rudy, T. A. (1978). Narcotic analgesics: Cns sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain*, 4(4), 299–359.
- [Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 2002] Yamamoto, T. & Nozaki-Taguchi, N. (2002). The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth Analg*, 94(4), 962–7, table of contents.
- [Yashpal &Coderre, 1998] Yashpal &Coderre (1998). Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin. *Eur J Pain*, 2(1), 63–68.
- [Yashpal et al., 1996] Yashpal, K., Katz, J., & Coderre, T. J. (1996). Effects of preemptive or postinjury intrathecal local anesthesia on

- persistent nociceptive responses in rats. confounding influences of peripheral inflammation and the general anesthetic regimen. *Anesthesiology*, 84(5), 1119–1128.
- [Yeziarski et al., 1982] Yeziarski, R. P., Bowker, R. M., Kevetter, G. A., Westlund, K. N., Coulter, J. D., & Willis, W. D. (1982). Serotonergic projections to the caudal brain stem: a double label study using horseradish peroxidase and serotonin immunocytochemistry. *Brain Res*, 239(1), 258–264.
- [Yuri & Kawata, 1991] Yuri, K. & Kawata, M. (1991). The effect of estrogen on the estrogen receptor-immunoreactive cells in the rat medial preoptic nucleus. *Brain Res*, 548(1-2), 50–54.
- [Zhuo & Gebhart, 1990] Zhuo, M. & Gebhart, G. F. (1990). Characterization of descending inhibition and facilitation from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Pain*, 42(3), 337–350.
- [Zhuo & Gebhart, 1992] Zhuo, M. & Gebhart, G. F. (1992). Characterization of descending facilitation and inhibition of spinal nociceptive transmission from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *J Neurophysiol*, 67(6), 1599–1614.

- [Zhuo & Gebhart, 1997] Zhuo, M. & Gebhart, G. F. (1997). Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J Neurophysiol*, 78(2), 746–758.
- [Zimmer, 1992] Zimmer, A. (1992). Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 15, 115–137.